

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA MAZETTO DE CARVALHO

**HETERORAMNANAS SULFATADAS OBTIDAS DE *GAYRALIA OXYSPERMA*:
INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL E
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO PARCIAL**

CURITIBA

2013

MARIANA MAZETTO DE CARVALHO

**HETERORAMNANAS SULFATADAS OBTIDAS DE *GAYRALIA OXYSPERMA*:
INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL E
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO PARCIAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Eugênia Duarte Nosedá

Coorientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Sheila Maria B. Winnischofer

CURITIBA

2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo grande incentivo que sempre me deram e por terem despertado em mim o interesse pelos estudos e pela busca do conhecimento.

À minha orientadora, prof. Eugênia, e aos meus co-orientadores prof. Sheila e prof. Miguel, pela orientação, pelos ensinamentos e por toda ajuda prestada nos momentos de dificuldade deste processo.

Aos meus amigos do laboratório anexo E3: Siliane, Pauline, Cassiano, Diego e Taís, pela amizade, companherismo e pelos conhecimentos transmitidos. E um agradecimento especial à Luciana, que me ajudou e me ensinou muito.

Aos colegas do laboratório 248 e aos demais colegas do grupo de carboidratos

À todos os colegas do cultivo celular.

À Juliana Kenski e à Cristiane Zuconelli, por todo o conhecimento transmitido na parte da atividade biológica, desde o mais básico até as análises de expressão gênica. E também à Juliana Bark, pelo apoio.

Aos meus colegas da turma de mestrado.

À Prof.^a Dr.^a Franciane Pellizzari pelas algal cedidas.

À Elisângela pelas análises de HPSEC e à Rosane pelas análises de GC-MS.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, representada pelo Prof. Miguel Daniel Nosedá, e a todos os professores do Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular.

À CAPES e ao PRONEX-Carboidratos pelo apoio financeiro.

À minha tia Marília à minha vó Iolanda, por terem me recebido tão bem quando eu me mudei pra Curitiba. E ao restante da família, pelo apoio e carinho.

À todos os meus amigos fora da bioquímica. Desde aqueles amigos que me acompanham desde a infância e aqueles que eu só fui conhecer mais tarde. Obrigada pela amizade, apoio e incentivo.

“O caos é uma ordem a ser desvendada.”

José Saramago

RESUMO

Estudos prévios realizados no Laboratório de Química de Carboidratos – Algas Marinhas demonstraram que heteroramnanas sulfatadas (OX-6) e seus produtos de menor massa molar (OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc) possuem atividade antitumoral contra linhagens U87MG de glioma humano. Com base nesses resultados, o objetivo do presente trabalho foi investigar o mecanismo pelo qual esses polissacarídeos provocam a diminuição na viabilidade das células de glioma humano. Para tanto, foi avaliado o efeito das frações OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc no ciclo, migração e recuperação celular, correlacionando com os níveis de RNAm de p21, p53 e p19. Foi verificado por análise de citometria de fluxo que o tratamento das células U87MG com os polissacarídeos promovem um aumento no número de células da fase G1 do ciclo celular, sem alteração no número de células na fase sub-G1. Ainda, não foi observado alteração na migração celular e na recuperação da proliferação das células após a retirada do tratamento. A análise do perfil de expressão gênica (investigada através do ensaio de PCR quantitativo em Tempo Real) indicou tendência de modulação de p21 e p53. Apesar de não terem sido observadas diferenças em relação ao mecanismo de atividade antitumoral dessas frações, foi observado, dentre os produtos de degradação controlada de Smith homogêneos (OX-6Sb e OX-6Sc) que a fração OX-6Sc é mais citotóxica quando comparada com a fração OX-6Sb. Análises químicas (metilação) realizadas previamente demonstraram que essas frações apresentam diferenças estruturais entre si, o que pode justificar a diferença observada na atividade biológica. Com o objetivo de confirmar os dados estruturais, a fração OX-6Sc foi submetida a uma nova abordagem de metilação, denominada trideuteriometilação. Essa análise confirmou os dados de estrutura química previamente obtidos. Ainda, foram obtidas novas frações polissacarídicas de *G. oxysperma*, as quais foram caracterizadas quimicamente e mostraram-se semelhantes aos produtos de degradação controlada de Smith utilizados na atividade biológica, demonstrando assim, a reprodutibilidade deste processo.

Palavras-chave: *Gayralia oxysperma*. Alga verde. Polissacarídeos sulfatados. Estrutura química. Glioma humano. Mecanismo de atividade antitumoral.

ABSTARCT

Previous studies conducted in Carbohydrate Chemistry - Seaweed Laboratory showed that sulphated heteroramnanas (OX-6) and its lower molecular weight (OX-6S, OX-6Sb and OX-6SC) have antitumor activity against strains U87MG products of human glioma. Based on these results, the aim of this study was to investigate the mechanism by which these polysaccharides cause a decrease in viability of human glioma cells. Therefore, we evaluated the effect of fractions OX-6, OX-6S, OX-6Sb and OX-6SC on cell cycle, migration and cell recovery, in relation with p21, p53 and p19 mRNA levels. Been established (by flow cytometric analysis) that treatment of U87MG cells with polysaccharides fractions promote an arrest of cells in G1 phase of cell cycle, with no change in sub-G1 phase. No change was observed in cell migration and cell proliferation recovery after remove treatment. Analysis of gene expression (investigated by quantitative real-time PCR) indicated a trend of modulation of p21 and p53. Although no differences were observed in mechanism of antitumor activity of these fractions, it was observed among the homogeneous Smith controlled degradation products (OX-6Sb and OX-6SC) the fraction OX-6Sc is more cytotoxic when compared with the fraction OX-6Sb. Chemical analyzes (methylation) performed previously demonstrated that these fractions have structural differences between them, which may explain the observed difference in biological activity. Aiming to confirm the structural data, the OX-6Sc fraction was subjected to a new approach methylation, called trideuteriomethylação. This analysis confirmed the chemical structure obtained. Still further polysaccharide were obtained from *G. oxysperma*, which were characterized and shown to be chemically similar to the controlled degradation products of Smith used in biological activity, thus demonstrating the reproducibility of this process.

Keywords: *Gayralia oxysperma*. green seaweed. Sulfated polysaccharides. Chemical structure. Human glioma. Mechanism of antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – UNIDADES REPETITIVAS PRESENTES NAS ULVANAS.....	23
FIGURA 2 - PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA HETERORAMNANA SULFATADA OBTIDA DE <i>G. OXYSPERMA</i>	26
FIGURA 3 – FASES DO CICLO CELULAR E SEUS REGULADORES POSITIVOS E NEGATIVOS.....	35
FIGURA 4 – RAO X DE UM PACIENTE DIAGNOSTICADO COM GLIOBLASTOMA MULTIFORME.....	40
FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DO QUIMIOTERÁPICO TEMOZOLAMIDA....	40
FIGURA 6 – LINHAGEM U87MG DE GLIOBLASTOMA HUMANO.....	56
FIGURA 7 – ASPECTO GERAL DA CLORÓFITA <i>G. oxysperma</i>	66
FIGURA 8- ANÁLISE DE CICLO CELULAR U87MG.....	77
FIGURA 9 - PORCENTAGENS DE CÉLULAS U87MG NA DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES OX-6, OX-6S, OX-6Sb E OX-6Sc.....	78
FIGURA 10 – ESQUEMA DO TESTE DE RECUPERAÇÃO CELULAR.....	80
FIGURA 11 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG NO TEMPO DE 48 HORAS.....	81
FIGURA 12 – RECUPERAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG APÓS 48 HORAS DA RETIRADA DO TRATAMENTO.....	82
FIGURA 13 - AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO DE <i>SCRATCH IN VITRO</i>	84
FIGURA 14 – NORMALIZAÇÃO DO ENSAIO DE <i>SCRATCH</i>	85
FIGURA 15 – MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE p21 DA LINHAGEM U87MG FRENTE AO TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS.....	87
FIGURA 16- SEQUÊNCIA METODOLÓGICA DO PROCESSO DE TRIDEUTERIOMETILAÇÃO DA FRAÇÃO OX-6Sc.....	88
FIGURA 17 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SINTETIZADOS PELA ALGA VERDE <i>G. oxysperma</i>	91

FIGURA 18 – ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>G. oxysperma</i> : Go-1,2 (a) Go-3 (b) Go-4 (c) Go-5 (d) Go-6 (e).....	96
FIGURA 19 – EXEMPLO HIPOTÉTICO DE CARBOIDRATO SUBMETIDO A DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH.....	98
FIGURA 20 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7.....	102
FIGURA 21 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7S.....	103
FIGURA 22 – ESPECTROS DA REGIÃO DO ANEL DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7 (a) E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH DE SMITH (b) OX-7S.....	104
FIGURA 23 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM ESPALHAMENTO DE LUZ NO ÂNGULO DE 90° E DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DA FRAÇÃO OX-7S.....	105
FIGURA 24 – COMPARAÇÃO DO PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES OX-7 E OX-7S.....	106
FIGURA 25 – COMPARAÇÃO DO PERFIL DE EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES a) OX-7S, OX-7Sd e OX-7Se e b)OX-7Sd e OX-7Se.....	109
FIGURA 26 – ESPECTROS DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7S (a) E DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS O FRACIONAMENTO EM DEAE-SEPHACEL OX-7Sc (b), OX-7Sd (c) e OX-7Se (e).....	110
FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7Sc.....	112
FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7Sd.....	113
FIGURA 29 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7Se.....	114
FIGURA 30 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7SdD.....	117
FIGURA 31 – ESPECTROS DE HSQC DA FRAÇÃO NATIVA OX-7Sd (a) e (c) E DESSULFATADA OX-7SdD (b) e (d).....	120
FIGURA 32- a) PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA FRAÇÃO OX-7Sd b) PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA FRAÇÃO OX-7SdD.....	121

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS DESCRITAS PARA POLISSACARÍDEOS DE ALGAS VERDES.....	28
TABELA 2 ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS FRAÇÕES Go3, Go3r E Go4 OBTIDAS DE <i>G. oxysperma</i>	30
TABELA 3 – ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS.....	48
TABELA 4- UNIDADES PRESENTES NAS FRAÇÕES NATIVAS OX-6Sb E OX-6Sc DE ACORDO COM OS DADOS DE METILAÇÃO.....	51
TABELA 5- PROPORÇÃO DE UNIDADES DE RAMNOSE 3- E 2-LIGADAS E 2,3-DISSUBSTITUÍDAS PRESENTES NA FRAÇÃO OX-6Sc.....	89
TABELA 6 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE <i>G. oxysperma</i>	93
TABELA 7 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>G. oxysperma</i>	94
TABELA 8 – ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO BRUTA (OX-7) E DE SEU PRODUTO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (OX-7S).....	99
TABELA 9 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO BRUTA (OX-7) E DE SEU PRODUTO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (OX-7S).....	99
TABELA 10 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA FRAÇÃO OX-7S.....	107
TABELA 11 –COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA FRAÇÃO OX-7S.....	108
TABELA 12- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ASSINALADOS A PARTIR DOS ESPECTROS MONO E BIDIMENSIONAIS DA FRAÇÃO DESSULFATADA OX-7SdD.....	122
TABELA 13- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ASSINALADOS A PARTIR DOS ESPECTROS MONO E BIDIMENSIONAIS DAS FRAÇÕES OX-7Sd E OX-7SdD.....	123

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

δ – deslocamento químico (em ppm)

^{13}C – carbono 13

^1H – próton

ANOVA – Análise de Variância

BSA – soro albumina bovina

cDNA – DNA complementar (à um mRNA)

CD₃ – grupo metil trideuterado

CH₃ – grupo metil

CLG – cromatografia líquida gasosa

CLG-EM – cromatografia líquida gasosa acoplada a espectrometria de massa

CMC – 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida

COSY – *correlation spectroscopy*

D₂O – água deuterada

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxiribonucleico

EGF – Fator de crescimento epidermal

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GBM – Glioblastoma multiforme

HPRT – Hipoxantina Fosforibosil Transferase

HPSEC-MALLS-RI – cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada a detector de índice de refração

HSQC – *heteronuclear single quantum correlation spectroscopy* a detectores de índice de refração e espalhamento de luz

ICD₃ – iodometano trideuterado

ICH₃ – iodometano

RNA_m – RNA mensageiro

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NaBD₄ – borodeutério de sódio

NaBH₄ – boroidreto de sódio

***m*-NaIO₄** – metaperiodato de sódio

ppm – partes por milhão

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RMN – ressonância magnética nuclear

RNA – Ácido Ribonucleico

RT- qPCR – PCR em Tempo-Real

SFB – soro fetal bovino

TFA – ácido trifluoracético

v/v – relação entre volume e volume

OX-6 – frações brutas de *G. oxysperma* reunidas

OX-6S – fração OX-6 após degradação controlada de Smith

OX-6Sb – fração degradada de Smith eluída com NaCl 1M em cromatografia de troca iônica

OX-6Sc – fração degradada de Smith eluída com NaCl 1,5M em cromatografia de troca iônica

Go-1,2 - fração bruta obtida por extração aquosa a 25 °C de *G. oxysperma*

Go3 a Go-6 – frações brutas obtidas por extrações aquosas a 80 °C de *G. oxysperma*

OX-7 – frações brutas de *G. oxysperma* reunidas (Go-3 a Go-6)

OX-7S – fração OX-7 após degradação controlada de Smith

OX-7Sd – fração degradada de Smith eluída com NaCl 1,25 M em cromatografia de troca iônica

OX-7SdD – fração dessulfatada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1 ALGAS – ASPECTOS GERAIS.....	21
3.2 ESTRUTURA QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE MACROALGAS VERDES.....	22
3.2.1 Estrutura química dos polissacarídeos sulfatados isolados da macroalga verde <i>Gayralia oxysperma</i>	25
3.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS VERDES.....	27
3.3.1 Atividades biológicas descritas para polissacarídeos de <i>G. oxysperma</i>	30
3.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR E CÂNCER.....	32
3.4.1 Vias de sinalização das cascatas de sobrevivência celular.....	32
3.4.2 Ciclo celular.....	34
3.4.3 Apoptose.....	36
3.5 Gliomas.....	37
3.5.1 Vias de sinalização de glioblastomas.....	38
3.5.2 Tratamento.....	39
3.6 ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS.....	41
3.6.1 Relação estrutura química e atividade.....	44
3.6.2 Atividade antitumoral de polissacarídeos obtidos de macroalgas verdes.....	46
3.6.3 Atividade antitumoral de heteroramnanas sulfatadas obtidas de <i>G. oxysperma</i>	47
4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	53

4.1 Investigação do mecanismo de atividade antitumoral de heteroramnanas sulfatadas obtidas de <i>Gayralia oxyperma</i>.....	53
4.2 Determinação do posicionamento dos grupos sulfato.....	53
4.3 OBTENÇÃO DE NOVAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE MENOR MASSA MOLAR.....	54
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
5.1 DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL in vitro DAS HETERORAMNANAS DE <i>G. oxyperma</i>.....	55
5.1.1 Procedimentos, soluções, meio de cultura e linhagens celulares.....	55
5.1.1.1 Esterilização dos materiais.....	55
5.1.1.2 Meio de cultura.....	55
5.1.1.3 Linhagens celulares.....	56
5.1.1.4 Condições de cultivo.....	56
5.1.1.5 Solução de tripsina-EDTA.....	57
5.1.1.6 Solução Salina Tamponada (PBS).....	57
5.1.1.7 Solução Salina Balanceada de Hank (HBSS).....	57
5.1.1.8 Preparação das frações polissacarídicas para o ensaio biológico.....	58
5.1.1.9 Solução Tampão hipotônico de iodeto de propídeo (IP).....	58
5.1.2 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	58
5.1.3 Avaliação da recuperação celular após a retirada do tratamento (avaliação do efeito citotóxico e/ou citostático).....	59
5.1.4 Avaliação da migração celular.....	61
5.1.5 Análise dos níveis de mRNA após o tratamento com as frações polissacarídicas OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc.....	61
5.1.5.1 Extração e purificação do RNA celular.....	61
5.1.5.2 Síntese de cDNA.....	63
5.1.3.3 Avaliação da modulação da expressão gênica.....	63
5.2 DETERMINAÇÃO DO POSICIONAMENTO DOS GRUPOS SULFATO.....	64
5.2.1 Trideuteriometilação.....	64
5.2.2 Análise de metilação.....	65
5.2.2.1 Preparo do Sal de Trietilamônio.....	65

5.2.2.2 Análise de Metilação.....	65
5.3 OBTENÇÃO DE NOVAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS.....	66
5.3.1 Posicionamento sistemático da espécie estudada.....	66
5.3.2 Coleta e processamento.....	67
5.3.3 Extração dos polissacarídeos.....	67
5.3.4 Degradação Controlada de Smith.....	68
5.3.5 Métodos analíticos gerais.....	69
5.3.5.1 Determinação do teor de Carboidratos Totais.....	69
5.3.5.2 Dosagem de Proteínas Totais.....	69
5.3.5.3 Dosagem de grupos Sulfato.....	69
5.3.5.4 Dosagem do teor de ácidos urônicos.....	70
5.3.6 Métodos hidrolíticos.....	70
5.3.6.1 Hidrólise ácida total.....	70
5.3.7 Métodos cromatográficos.....	71
5.3.7.1 Cromatografia de Troca Iônica (DEAE-Sephacel).....	71
5.3.7.2 Cromatografia Líquido-Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CLG-EM).....	71
5.3.7.3 Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão (HPSEC) Acoplada a Detector de Índice de Refração (IR) Diferencial e Espalhamento de Luz em multiângulos (MALLS).....	72
5.3.8 Dessulfatação por Tratamento Solvolítico.....	73
5.3.8.1 Preparo do sal de piridínio.....	73
5.3.8.2 Solvólise.....	73
5.3.9 Métodos espectroscópicos.....	74
5.3.9.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	74
5.3.9.2 Técnicas de RMN Monodimensionais.....	74
a) Ressonância Magnética Nuclear de Carbono –13 (RMN de ¹³ C).....	74
b) Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN – ¹ H).....	74
5.3.9.3 Técnicas de RMN Bidimensionais.....	75
a) HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy).....	75

b) COSY (<i>Correlation Spectroscopy</i>).....	75
6 RESULTADOS.....	76
6.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>in vitro</i> DAS HETERORAMNANAS DE <i>G. oxysperma</i>	76
6.1.1 Análise do Ciclo Celular.....	76
6.1.2. Avaliação da Recuperação Celular.....	79
6.1.3 Avaliação da migração celular.....	82
6.1.4 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE mRNA DE p21 APÓS O TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS.....	85
6.2 CONFIRMAÇÃO DO POSICIONAMENTO DOS GRUPAMENTOS SULFATO NA FRAÇÃO OX-6Sc.....	87
6.2.1 TRIDEUTERIOMETILAÇÃO.....	87
6.3 ESTRUTURA QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS DE <i>G. oxysperma</i>	90
6.3.1 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.....	90
6.3.2 RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES BRUTAS.....	92
6.3.3 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES BRUTAS.....	93
6.3.4 ANÁLISES DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>G.</i> <i>oxysperma</i>	94
6.3.5 DEGRADAÇÃO DE SMITH.....	97
6.3.6 Análises químicas e composição monossacarídica da fração degradada de Smith.....	98
6.3.7 Análises de RMN do produto de degradação de Smith (OX-7S).....	100
6.3.8 Análise da homogeneidade da fração OX-7S.....	105
6.3.9 FRACIONAMENTO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (OX-7S).....	106
6.3.10 Rendimento e análises químicas das frações obtidas a partir de OX-7S após a cromatografia de troca iônica.....	107
6.3.11 Análise da homogeneidade.....	108
6.3.12 Análises de RMN de ¹³ C da fração OX-7Sc, OX-7Sd e OX-7Se.....	109
6.3.13 DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DA FRAÇÃO OX-7Sd.....	115
6.3.14 ANÁLISES DE RMN BIDIMENSIONAIS DA FRAÇÃO OX-7Sd E OX- 7SdD.....	115

7 DISCUSSÃO FINAL.....	124
8 CONCLUSÕES.....	131
REFERÊNCIAS.....	132

1 INTRODUÇÃO

Macroalgas verdes (filo *Chlorophyta*) são organismos antigos e abundantes que constituem uma importante fonte de novos compostos bioativos. Dentre esses compostos, destaca-se seus polissacarídeos sulfatados, polímeros que apresentam grande diversidade estrutural e aos quais já foram descritas diversas atividades biológicas, tais como anticoagulante (MAO *et al.*, 2009; HARADA e MAEDA, 1998), antiviral (CASSOLATO *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2010), antioxidante e imunomoduladora (LEIRO *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2011; NA *et al.*, 2010), antitumoral (KWON e NAM, 2006), anti-ulcerosa (HWANG *et al.*, 2008), anti-hiperlipidêmica e hipocolesterolêmica (GORAD *et al.*, 2009; HASSAN *et al.*, 2011; PENGZHAN *et al.*, 2003; SATHIVEL *et al.*, 2008).

O Brasil possui uma grande biodiversidade de macroalgas verdes por toda a sua costa, porém estudos estruturais e de aplicação biológica dos produtos produzidos por esses organismos são relativamente escassos.

Estudos estruturais conduzidos com os polissacarídeos solúveis em meio aquoso obtidos de *Gayralia oxysperma* demonstraram que esta macroalga verde sintetiza heteroramnanas sulfatadas (CASSOLATO *et al.*, 2008). Ainda nesse estudo, foi demonstrado que esses compostos possuem potente atividade anti-herpética contra o vírus herpes simplex 1 (HSV-1) e herpes simplex 2 (HSV-2) quando comparado com os demais polissacarídeos obtidos de outras algas verdes. Essa atividade foi específica para o vírus herpes simplex, apresentando baixa citotoxicidade para células Vero (células não tumorais de rim de macaco verde africano).

Dando continuidade aos estudos de atividade biológica, Ropelatto (2011) demonstrou que as heteroramnanas sulfatadas obtidas de *Gayralia oxysperma* e seus produtos de menor massa molar, obtidos através de degradação controlada de Smith, apresentaram atividade citotóxica contra linhagens de glioma humano (U373MG e U87MG).

Gliomas humanos são tumores de origem neuroepitelial e dentre os tumores cerebrais humanos são os que apresentam maior incidência. Essa doença apresenta um fenótipo agressivo e que pode levar o paciente a óbito em até 15 meses (ABTA, 2011). Desta forma, é de extrema importância a busca de novos compostos com atividade contra esse tipo de tumor.

Considerando que o estudo realizado por Ropelatto (2011) demonstrou pela primeira vez que polissacarídeos sulfatados possuem atividade antitumoral contra linhagens de glioma humano, no presente estudo será avaliado o mecanismo pelo qual os polissacarídeos solúveis sulfatados de *Gayralia oxysperma* e seus produtos de menor massa molar exercem essa atividade. Considerando ainda que Ropelatto (2011) observou diferenças quanto à redução na viabilidade celular entre as diferentes frações testadas, esse trabalho também tem como objetivo confirmar os dados estruturais previamente obtidos.

Além disso, novos fragmentos potencialmente bioativos serão obtidos a partir das heteroramnanas sulfatadas sintetizadas por essa espécie de macroalga verde e serão caracterizados quimicamente, visando verificar a reprodutibilidade do processo de fracionamento dos produtos de degradação controlada de Smith para esses polissacarídeos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

✓ Investigar o mecanismo de ação antitumoral de heteroramnanas sulfatadas e de seus produtos de degradação parcial obtidos da alga verde *Gayralia oxysperma* em células de glioma humano e confirmar a estrutura química dos produtos de menor massa molar.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito das frações polissacarídicas denominadas OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc no ciclo celular, na morte celular e na migração celular da linhagem de glioma humano U87MG.
- ✓ Avaliar a recuperação da proliferação celular após o tratamento com as frações OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6sc.
- ✓ Avaliar os níveis de expressão de mRNA no ciclo celular.
- ✓ Extrair os polissacarídeos solúveis em meio aquoso a 25°C e 80°C.
- ✓ Obter novos fragmentos de menor massa molar através do método de degradação controlada de Smith.
- ✓ Submeter os produtos de degradação de menor massa molar ao fracionamento em cromatografia de troca iônica.
- ✓ Verificar a homogeneidade dos novos produtos de degradação controlada de Smith através da técnica de cromatografia de gel permeação (HPSEC-MALLS).

- ✓ Caracterizar quimicamente os novos produtos de degradação homogêneos por métodos químicos e espectroscópicos.
- ✓ Correlacionar a estrutura química das heteroramnanas e de seus produtos de degradação controlada de Smith com a sua atividade antitumoral.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ALGAS VERDES – ASPECTOS GERAIS

Macroalgas pertencem ao reino Plantae, o qual é formado por organismos pluricelulares, eucariontes, heterótrofos e compostos por pigmentos fotossintéticos protetivos e acessórios que garantem a essas algas uma variedade de cor, pelas quais são comumente classificadas em três filos: Phaeophyta, Rodophyta e Chlorophyta. O filo Phaeophyta corresponde às algas pardas, Rodophyta às vermelhas e Chlorophyta às verdes (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

A maioria das clorófitas são aquáticas, mas também podem ser encontradas na superfície da neve, troncos de árvores e em associações simbióticas com fungos. São formadas pelas classes Ulvophyceae, Charophyceae, Bryopsidophyceae e Dasycladophyceae (HOEK, MAHNS e JAHNS, 1995).

A classe Ulvophyceae é predominantemente constituída por espécies marinhas, embora haja alguns representantes de água doce (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2001). Encontram-se distribuídas por praticamente toda a costa brasileira e são mais abundantes nas costas oceânicas rochosas (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Pertencem a classe Ulvophyceae as ordens: Ulvales, Ulvotrichiales e Cladophorales (HOEK, MAHNS e JAHNS, 1995).

Macroalgas da classe Ulvophyceae, em especial aquelas da ordem Ulvales, possuem uma grande importância econômica, pois são usadas na indústria alimentícia, cosmética e na agricultura (HOEK, MAHNS e JAHNS, 1995; VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004). Os gêneros mais comuns de algas da ordem Ulvales são: *Monostroma sp.*, *Ulva sp.* e *Enteromorpha sp.* (HOEK, MAHNS e JAHNS, 1995).

Recentemente têm sido investigados novos compostos bioativos obtidos de macroalgas verdes da ordem Ulvales, em especial, seus polissacarídeos sulfatados, aos quais já foram descritas diversas atividades biológicas (HARADA e MAEDA, 1998; LEIRO *et al.*, 2007; CASSOLATO *et al.*, 2008; WIJESEKARA, PANGESTUTI e KUN, 2011). Esses organismos sintetizam uma gama estrutural diversificada de polissacarídeos sulfatados, sendo que o conhecimento da estrutura química desses

polissacarídeos é de fundamental importância para a compreensão das atividades biológicas exercidas por esses polímeros.

3.2 ESTRUTURA QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE MACROALGAS VERDES

Polissacarídeos obtidos de macroalgas da ordem Ulvales (*Monostroma*, *Ulva* e *Enteromorpha* sp.) produzem glucuronoxiloramnanas, os quais são denominados ulvanas (LAHAYE e AXELOS, 1993). Um dos primeiros trabalhos a mostrar a composição monossacarídica destas moléculas foi descrito por Brading; George-Plant e Hardy (1954), o qual demonstrou que polissacarídeos obtidos de *Ulva lactuca* são formados principalmente por unidades de ramnose, ácido urônico e xilose.

Após a identificação da ramnose como principal monossacarídeo constituinte dos polissacarídeos isolados de *Ulva lactuca*, Mckinnell e Percival (1962b) isolaram unidades dissacarídicas formadas por unidades de ácido D-glucurônico ligado ao carbono- 4 (C-4) de unidades de L-ramnose, ou seja, um ácido aldobiurônico. Anos mais tarde foi demonstrado que essa é a principal unidade repetitiva das ulvanas (LAHAYE e RAY, 1996). Percival e Wold (1963) identificaram o carbono- 2 (C-2) das unidades de ramnose como o principal sítio de sulfatação, além da presença de grupamentos sulfato no C-2 de unidades de xilose. A posição dos grupos sulfato no C-2 das unidades de ramnose foi caracterizada pela vibração em 850 cm^{-1} na análise de infravermelho (IV). Porém, estudos posteriores com ulvanas obtidas desta mesma espécie e seus oligossacarídeos produzidos através de hidrólise ácida branda identificaram sulfatação no carbono-3 (C-3) da ramnose (HAQ *et al.*, 1966).

Posteriormente, Quemener, Lahaye e Bobin-Dubigeon (1997) propuseram um método para otimizar a investigação da estrutura química destes polissacarídeos. A metodologia consiste em uma hidrólise ácida branda seguida de uma posterior clivagem da ligação da ramnose com o ácido glucurônico através da ação da enzima β -D-glucoronidase. A técnica permitiu a quantificação simultânea dos açúcares

neutros e ácidos presentes no polissacarídeo e ainda, possibilitou a identificação do ácido idurônico como constituinte das ulvanas.

Estudos utilizando os oligossacarídeos das ulvanas obtidas de *Ulva lactuca* e *Ulva rigida* indicam a presença de várias unidades repetitivas com sulfatação principalmente no C-3 da ramnose, e não em C-2 como observado nos primeiros estudos. Essa descoberta mostra que a região de $810\text{-}860\text{ cm}^{-1}$ do espectro de IV não é precisa na identificação do posicionamento dos grupos sulfato (LAHAYE e RAY, 1996). Como citado anteriormente, a principal unidade repetitiva encontrada foi o ácido aldobiurônico, o qual foi denominado ácido ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A (A_{3S}). O ácido glucurônico pode ser substituído pelo ácido idurônico, recebendo então o nome de ácido ulvanobiurônico tipo B (B_{3S}) ou pela xilose, formando a unidade ulvanobiose 3- sulfato (U_{3S}). Quando o C-2 da xilose também se encontra sulfatado, a unidade passa a se chamar ulvanobiose 2', 3-dissulfato ($U_{2'S,3S}$). Ainda, a ramnose pode estar ramificada em C-2 por unidades de ácido glucurônico dando origem a unidade ácido ulvanobiouronico 2' ácido glucurônico, 3-sulfato tipo A ($A_{2g,3S}$) (LAHAYE, 1998; LAHAYE, INIZAN e VIGOUROUX, 1998) (figura 1).

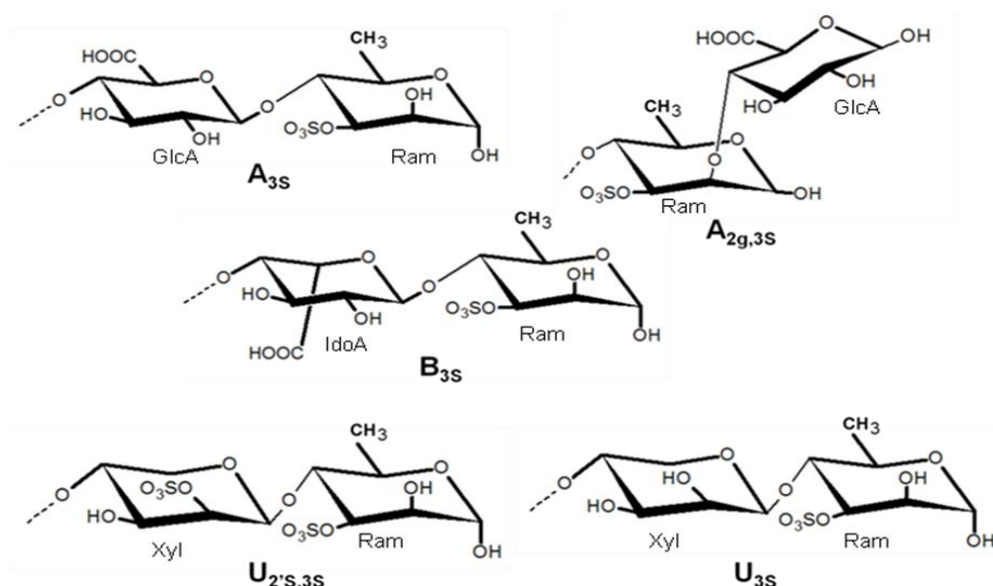


FIGURA 1 – UNIDADES REPETITIVAS PRESENTES NAS ULVANAS

FONTE: O Autor, 2013.

NOTA: A_{3S} = ácido aldobiurônico 3- sulfato tipo A; $A_{2g,3S}$ = ulvanobiouronico 2' ácido glucurônico, 3-sulfato tipo A; B_{3S} = ulvanobiurônico tipo B; U_{3S} = ulvanobiose 3- sulfato e $U_{2'S,3S}$ =ulvanobiose 2', 3-dissulfato.

Os estudos com algas do gênero *Enteromorpha* sp. também demonstraram que essas espécies de algas verdes produzem polissacarídeos denominados ulvanas, assim como descrito para as espécies de *Ulva* (McKINNEL e PERCIVAL, 1962a, RAY, 2006; TABARSA *et al.*, 2012). Porém, diferentemente do que é comumente descrito, foi obtido de *Enteromorpha clathrata*, a partir da extração aquosa a 100 °C durante 2 horas, um polímero formado majoritariamente por arabinose (80,5 %), além de unidades de ramnose (10,7 %), galactose (4,8 %) e ácido glucurônico (4,0 %) e com 31,0 % de grupamentos sulfato. As análises de metilação e de RMN da fração purificada nativa e dessulfatada mostraram que esse polissacarídeo é formado por unidades de α -L arabinose 4-ligadas, 3,4-ligadas e 4-ligadas-3-sulfatadas. As unidades de ramnose podem estar 3-ligadas, 3,4-ligadas e 3-ligadas-4-sulfatadas (QI *et al.*, 2012).

Polissacarídeos obtidos das algas do gênero *Monostroma* também apresentam ramnose como principal monossacarídeo, porém, a estrutura química destes difere-se daquela descrita para as ulvanas. Tanto *Monostroma nitidum* quanto *Monostroma latissimum* biossintetizam polissacarídeos cuja cadeia principal é formada por unidades de α -L-ramnose 2- e 3-ligada. Os grupos sulfato encontram-se no C-3 e no carbono- 4 (C-4) para *Monostroma latissimum* e em C-2 para *Monostroma nitidum*. Esta última ainda pode apresentar ramificações em C-2 ou em C-3 (HARADA e MAEDA, 1998; LEE *et al.*, 1998). Recentemente, um estudo conduzido com produtos de menores massas molares obtidos através de hidrólise ácida dos polissacarídeos de *Monostroma latissimum* identificou um polímero com unidades de ramnose 3-ligada 2-sulfatada (LI *et al.*, 2012).

Além das macroalgas da ordem Ulvales, pertencem à classe Ulvophyceae as ordens Ulotrichiales e Cladophoralis. A primeira é formada por algas do gênero *Capsosiphon*, a qual já foi descrita para a alga *Capsosiphon fulvescens* a presença de um polissacarídeo cuja cadeia principal é formada por unidades de manose 4- e 2-ligada com presença de grupamentos sulfato no C-3 das unidades de ramnose (KARNJANAPRATUM *et al.*, 2012). Na ordem Cladophoralis, a qual é formada dentre outras por macroalgas dos gêneros *Cladophora* sp. *Chaetomorpha* sp. e *Spongomorpha* sp. foram descritas as presenças de xiloarabinogalactanas, ramnogalactoarabinana, xiloarabinogalactanas e xilomanogalactanas sulfatadas, com diferentes padrões de ligação e de posicionamento do grupo sulfato (RAO E

RAO, 1986; RAMANA e RAO, 1991; RAO e RAMANA, 1991; RAO, RAO E RAMANA, 1991).

3.2.1 Estrutura química dos polissacarídeos sulfatados isolados da macroalga verde *Gayralia oxysperma*

A macroalga *Gayralia oxysperma* é uma alga verde de talo monostromático pertencente à ordem Ulvales. É comum em manguezais, sendo encontrada por toda a costa brasileira, porém é mais abundante na região sul (OLIVEIRA *et al.*, 1999). É uma espécie oportunista e aparentemente não têm concorrentes. Não apresenta seletividade para o substrato (tipo de solo), o que é uma vantagem para os programas de aquicultura. A produção de biomassa é maior no final do inverno e início da primavera, períodos com temperatura entre 21 e 23 °C, precipitação mais baixa, alta salinidade (30-33 psu) e radiação variável (400 a 600 mW/m²). Seu crescimento é limitado principalmente pela temperatura (PELLIZZARI *et al.*, 2007).

Cassolato *et al.* (2008), ao estudarem os polissacarídeos sintetizados por *Gayralia oxysperma*, obtiveram frações brutas semelhantes entre si, constituídas principalmente por unidades de ramnose (56-88,6 mol %), além de xilose (3,9-10,4 mol %), arabinose (3,0-10,1mol %), glucose (2,8-21mol %), galactose (2,1-6,2 mol %) e manose (1,2-2,5 mol %). Esses polissacarídeos apresentam um alto teor de sulfato (21,2 a 30,9 %) e ácido urônico (12,2 a 17 %). A fração de maior rendimento foi purificada por ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 300 kDa, obtendo-se um produto homogêneo de massa molar ponderal média de 1519 kDa.

Para determinar a estrutura química deste polissacarídeo, foram conduzidas análises químicas (metilação) e espectroscópicas (RMN mono e bidimensionais) com a fração homogênea carboxi-reduzida e carboxi-reduzida dessulfatada. Assim, foi possível determinar que a *Gayralia oxysperma* sintetiza heteroramnanas constituídas por uma cadeia principal contendo unidades de α -L-ramnose 3- e 2-ligadas, onde as unidades 2-ligadas estão parcialmente ramificadas em C-3 por unidades de ácido glucurônico e galacturônico 2-sulfato e xilose. As unidades de

ramnose estão dissulfatadas (16,0 %), sulfatadas em C-2 (27,0 %), sulfatadas em C-4 (37,0 %) e não sulfatadas (20,0 %) (CASSOLATO *et al.*, 2008) (figura 2).

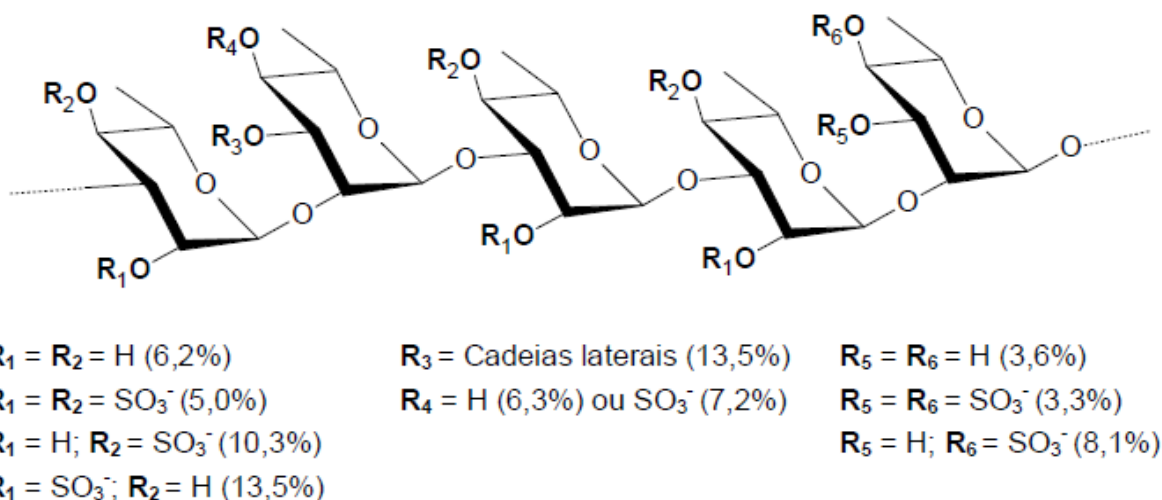


FIGURA 2 - PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA HETERORAMNANA SULFATADA OBTIDA DE *G. OXYSPERMA*

FONTE: CASSOLATO *et al.*, 2008.

NOTA: % - mol %. Cadeias laterais contêm como terminais não redutores: Glcp 2-sulfato (5 mol %) ou GalpA 2-sulfato (4 mol %) ou Xilp (5 mol %).

Ainda, as heteroramnanas de *Gayralia oxysperma* foram submetidas ao processo de degradação controlada de Smith, o qual baseia-se no fato que moléculas que possuam hidroxilas vicinais são susceptíveis a oxidação pelo íon periodato, com a clivagem específica de ligações C-C (CORRÊA, 1971). Foi verificado que o processo de degradação de Smith realizado com a heteroramnana homogênea de *Gayralia oxysperma* gerou fragmentos com massas molares menores e com uma maior proporção de grupamentos sulfatos (CASSOLATO *et al.*, 2008). Essas frações de menor massa molar e altamente sulfatadas podem apresentar um grande potencial biológico, já que diversos estudos realizados com polissacarídeos de algas pertencentes a diferentes filos, correlacionam a atividade biológica com o aumento do teor de grupos sulfato. (HAROUN-BOUHEDJA *et al.* 2000; CASTRO *et al.*, 2008, CHO *et al.*, 2011).

3.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS VERDES

Diversas atividades já foram descritas para os polissacarídeos sulfatados obtidos de algas verdes, tais quais anticoagulante, antiviral, gastroprotetora, antioxidante, antiinflamatória e antinoceceptiva (HARADA e MAEDA, 1998; LEIRO *et al.*, 2007; CASSOLATO *et al.*, 2008; MAO *et al.*, 2009; HASSAN. *et al.*, 2011). Essas atividades estão descritas na tabela 1.

Em relação à atividade imunomoduladora, polissacarídeos obtidos de algas verdes estimularam a produção de óxido nítrico (NO) em modelo de macrófagos de murino RAW 264.7 através do aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Ainda, Castro *et al.* (2008) demonstraram pelo método do NBT (nitroazul de tetrazólio) que a ulvana extraída de *Ulva rigida* é capaz de aumentar a capacidade respiratória de leucócitos obtidos de fígado de peixes da espécie *Psetta maxima* L. Assim, polissacarídeos sulfatados obtidos de algas mostraram-se capazes de modular a função de fagócitos, podendo ser usados como estimulantes do sistema imune. Esses polissacarídeos aumentaram a produção de NO, um mensageiro intracelular que regula funções celulares como a inflamação, bem como a defesa contra patógenos e células tumorais (LEIRO *et al.*, 2007; SURGH, 2007; NA *et al.*, 2010; KIM *et al.* 2011).

Recentemente, tem sido sugerido que polissacarídeos sulfatados isolados de diferentes filos de macroalgas possuem atividade antitumoral, porém estudos que demonstrem a atividade antitumoral de polissacarídeo obtidos de macroalgas verdes ainda são escassos. Estudos demonstram que ramnanas e manoxilanas sulfatadas obtidas de *Monostroma nitidum* e de *Capsosiphon fulvescens*, respectivamente, diminuíram a viabilidade de células de câncer gástrico (AGS) (KWON e NAM, 2007; KARNJANAPRATUM e YOU, 2011). Polissacarídeos sulfatados obtidos de outros filos de macroalgas demonstraram atividade antitumoral contra diferentes linhagens celulares. Esses estudos serão discutidos adiante.

TABELA 1 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS DESCRITAS PARA POLISSACARÍDEOS DE ALGAS VERDES

Atividade biológica	Alga ^a	Características do Polissacarídeo	Concentração/Ação	
Anticoagulante	¹ <i>Monostroma latissimum</i>	Ramnanas sulfatadas 23,4 % de SO ₃ ⁻ , 3,2 % de urônicos	2-50 µg/ml/ Inibiu a trombina através do co-fator II	
	² <i>Codium dwarkense</i>	Arabinogalactanas sulfatadas 20,5 a 41,5 % de SO ₃ ⁻ , 1,5 % de urônicos	1-100 µg/ml/ -----	
	³ <i>Codium cylindricum</i>	Gal;Glc= 89,0; 11,0 % 13,1 % de SO ₃ ⁻	1,5-15 µg/ml/ Não ativou antitrombina III e nem o co-fator II	
	⁴ <i>Monostroma nitidum</i>	28 % de SO ₃ ⁻	Ativou a antitrombina III	
Anti-herpética	^{5,6} <i>Monostroma nitidum</i>	Ramnanas sulfatadas	(HSV-1) CI 50= 0,4- 3,7 µg/ml	Inibição da adesão do vírus à célula
	⁵ <i>Chaetomorpha spiralis</i>	Arabinoxiloglucanas sulfatadas	(HSV-1) CI 50= 1,9-18 µg/ml	
	⁵ <i>Chaetomorpha crassa</i>	Arabinoxiloglucanas sulfatadas	(HSV-1) CI 50= 8,5-56 µg/ml	
	⁵ <i>Caulerpa scapelliformis</i>	Xilomanogalactanas sulfatadas	(HSV-1) CI 50= 1,6-7,6 µg/ml	
	⁵ <i>Caulerpa okamurai</i>	Xilomanogalactanas sulfatadas	(HSV-1) CI 50= 0,55-10 µg/ml	
	^{5,7} <i>Codium fragile</i>	Xiloarabinanas sulfatadas e galactanas sulfatadas e piruvatadas	(HSV-1) CI 50= 0,86-5,1 µg/ml (HSV-2) CI 50= 4,7 a 16 µg/ml	
	⁵ <i>Codium latum</i>	Arabinanas sulfatadas	(HSV-1) CI 50= 0,38 a 0,36 µg/ml	
	⁵ <i>Codium adharenses</i>	Glucoxiloarabinanas sulfatadas	(HSV-1) CI 50= 1,0-3,6 µg/ml	
	⁵ <i>Caulerpa brachypus</i>	Xilanas sulfatadas	(HSV-1) CI 50= 1,9-9,6 µg/ml	
	⁸ <i>Gayralia oxysperma</i>	Heteroramnanas sulfatadas 25,8 % de SO ₃ ⁻ , 19,0 % de urônicos	(HSV-1) CI 50= 0,27 a 0,30 µg/ml	
Anti-ulcerosa	⁹ <i>Capsosiphon fulvescences</i>	Não informado	0,01 a 0,25 % /Inibiu fosforilação de ERK e AKT e diminuiu a expressão de cox-2 e iNOS em ratos com úclera provocada pelo álcool.	
Antinoceptiva e anti-inflamatória	¹⁰ <i>Caulerpa cupressoides</i>	Não informado	3,9 e 27 µg/ml / Diminuiu o número de contorsões provocadas por ácido acético, o edema de pata e a migração dos neutrófilos	

Continuação...

Anti-oxidante	¹¹ <i>Enteromorpha Linza</i>	16,2 % de SO ₃ ⁻ , 11,9 % de urônico Gal;Glc;Rha;Xyl;Man= 0,04; 0,03; 1,0; 0,36; 0,04	
	^{11, 12} <i>Ulva pertusa</i>	¹¹ 19,9 % de SO ₃ ⁻ , 19,2 % de urônico ¹² Gal;Glc;Ara;Rha;Xyl;Man= 0,01; 0,29; 0,04; 1,0; 0,49; 0,06 ¹² Ulvanas submetidas ao processo de acetilação e benzilação	0,02-3 mg/ml/ Inibiu os efeitos dos radicais superóxido e hidroxil <i>in vitro</i>
	¹¹ <i>B. plumose</i>	7,56 % de SO ₃ ⁻ , 7,7 % de urônico Gal;Fuc;Glc;Ara;Rha;Man= 1,0; 0,23;0,11; 0,72; 0,10;0,17	
	¹³ <i>Monostroma nitidum</i>	Rha;Glc;Xyl;Fuc;Man;Ara= 25,8; 10,5; 1,7; 5,6; 3,0; 7,0 %	Aumentou a expressão UGT1A1 e UGT1A6 e diminuiu a expressão de CYP1A1 em ratos
Anti-hiperlipidêmicos	¹⁴ <i>Ulva rigida</i>	Ulvanas sulfatadas	50 g/Kg/ Diminuiu os níveis de colesterol total, LDL e TAG em ratos. Aumentou a atividade de GSH e diminuiu os níveis de superóxido e peroxidação lipídica
	^{15, 16, 17} <i>Ulva pertusa</i>	¹⁵ Ulvanas 17 % de SO ₃ ⁻ , 23 % de urônico ^{16, 17} Ulvanas submetidas ao processo de sulfatação ou acetilação	¹⁵ 0,5 g/100g e 250 mg/Kg/ O extrato bruto diminuiu os níveis de colesterol total e LDL. As frações de menor massa molar diminuíram os níveis de TAG
	^{18, 19} <i>Ulva lactuca</i>	Ulvanas sulfatadas	0,5 g/100g e 250 mg/Kg/ Diminuiu níveis de lipídios totais, TAG, colesterol total, LDL, VLDL e o índice de aterogenicidade. Não alterou HDL. Aumentou a atividade de GSH.
Imunomoduladora	^{20, 21} <i>Ulva rigida</i>	²⁰ Ulvanas sulfatadas Rha= 48,0 %, urônicos= 46 % ²¹ Rha;Ara;Xyl;Glc = 46,2; 4,7; 38; 4,2 %	0,8-100 µg/ml/ Aumentou a taxa respiratória de leucócitos do fígado de peixes. Aumentou os níveis de IL-1β e a expressão de iNOS, cox-2. PGE2, IL-6 e IL-2
	^{22, 23} <i>Enteromorpha prolifera</i>	Não informado	12,5-50 µg/ml/ Aumentou a expressão de iNOS, TNF-α, cox-2 e de citocinas IL-6 e IL-10 em macrófagos
	²⁴ <i>Monostroma nitidum</i>	Não informado	Aumentou a proliferação de macrófagos e a produção de NO, PGE ₂ e citocinas
	^{25, 7} <i>Codium fragile</i>	^{25, 7} Galactanas sulfatadas.e piruvatadas	1-100 µg/ml/ Aumentou a expressão de iNOS, TNF-α e de citocinas como IL-1b, IL-6, IL-10
	²⁶ <i>Capsosiphon fulvescences</i>	5,7 % de SO ₃ ⁻ , 4,8 % de urônico Man;Gal;GlcA;Ara= 55,4; 25,3; 16,3; 2,8 %	1,25-10 µg/ml/ Estimulou a produção de TNF-α e IL-6, iNOS e cox-2.

^a O número ao lado esquerdo da espécie de alga corresponde a referência bibliográfica, ---- = não determinado, Rha= ramnose, Gal= galactose, Glc= glucose, Aglc= ácido glucurônico, CI50= metade da concentração inibitória máxima, HSV-1= vírus herpes simplex tipo 1, HSV-2= vírus herpes simplex tipo 2. Ref: 1- MAO *et al.*, 2009; 2- SIDDHANTA *et al.*, 1999; 3-MATSUBARA *et al.*, 2001; 4- HARADA e MAEDA, 1998; 5-LEE *et al.*, 2004; 6-LEE, *et al.*, 2010; 7- OHTA *et al.*, 2009; 8- CASSOLATO *et al.*, 2008; 9- HWANG *et al.*, 2008; 10- RODRIGUES *et al.*, 2012; 11- ZHANG *et al.*, 2010; 12- QI *et al.*, 2006; 13- CHARLES *et al.*, 2007; 14- GORAD *et al.*, 2009; 15- PENGZHAN *et al.*, 2003; 16- QI *et al.*, 2012; 17- QI *et al.*, 2012; 18- HASSAN *et al.*, 2011, 19- SATHIVEL *et al.*, 2008; 20- CASTRO *et al.*, 2006; 21- LEIRO *et al.*, 2007; 22- KIM *et al.*, 2011; 23- CHO *et al.*, 2010; 24- KARNJANAPRATUM *et al.*, 2011; 25- LEE *et al.*, 2010; 26- NA *et al.*, 2010.

FONTE: O autor, 2013.

3.3.1 Atividades biológicas descritas para polissacarídeos de *G. oxysperma*

Além da determinação da estrutura química dos polissacarídeos obtidos de *Gayralia oxysperma*, Cassolato *et al.* (2008) demonstraram que as heteroramnanas sulfatadas produzidas por essa espécie de macroalga possuem potente atividade antiherpética quando comparada com os polissacarídeos produzidos pelas demais espécies de algas verdes.

Na tabela 2 encontram-se os resultados da atividade antiviral obtidos por Cassolato *et al.*, (2008), tanto para os extratos brutos (Go3 e Go4) quanto para a fração homogênea obtida através de ultrafiltração de membrana (Go3r).

TABELA 2 ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS FRAÇÕES Go3, Go3r E Go4 OBTIDAS DE *G. oxysperma*

Frações	CI ₅₀ (µg/ml) ^a		IS (CC ₅₀ /CI ₅₀) ^b	
	HSV-1 (F)	HSV-2 (MS)	HSV-1 (F)	HSV-2 (MS)
Go3	0,30 ± 0,15	0,054 ± 0,006	>3333	>18518
Go3r	0,27 ± 0,03	0,036 ± 0,001	>3704	>27778
Go4	0,28 ± 0,12	0,037 ± 0,001	>3571	>27027
Heparina	1,30 ± 0,1	0,50 ± 0,1	>769	>2000

NOTA: ^a CI₅₀ (concentração inibitória 50 %): concentração necessária para reduzir em 50 % o número de placas em células Vero. Cada valor é a média de duas determinações ± SD; ^b IS (índice de seletividade): CC₅₀/IC₅₀. CC₅₀ (concentração citotóxica 50 %): concentração necessária para reduzir 50% do número de células Vero viáveis. Esta concentração foi > 1000 µg/mL para todas as frações testadas. ^cHeparina incluída como polissacarídeo de referência.

Tanto os extratos brutos quanto a fração homogênea apresentaram CI₅₀ na ordem de 0,27 a 0,30 µg/ml para o vírus herpes simplex 1 (HSV-1) e de 0,036 a 0,054 µg/ml para o vírus herpes simplex, g 2 (HSV-2). Esses valores são dez vezes menores que os da heparina, polissacarídeo usado como referência (CASSOLATO *et al.*, 2008). O CI₅₀ das heteroramnanas de *Gayralia*

oxysperma também foi menor quando comparado com os valores obtidos por polissacarídeos obtidos de algas verdes do gênero *Monostroma*, *Codium*, *Chaetomorpha* e *Caulerpa*, cujos valores encontram-se entre 0,36 a 56 µg/ml (HSV-1) e 4,7 a 16 µg/ml (HSV-2) (LEE *et al.*, 2004; OHTA *et al.*, 2009; LEE, *et al.*, 2010).

As heteroramnanas sulfatadas obtida de *Gayralia oxysperma* também foram testadas quanto a sua citotoxicidade através do teste de viabilidade das células Vero (linhagens de células não tumorais de rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*). Nenhum efeito foi observado nessas células, mesmo em concentrações maiores de 1000 µg/ml. Os polissacarídeos testados apresentaram elevados índices de seletividade ($IS = CC_{50}/CI_{50}$), na ordem de >3333 a >27778, demonstrando a especificidade do efeito inibitório desses polímeros contra o vírus herpes simplex (CASSOLATO *et al.*, 2008).

Dando continuidade aos estudos de atividade biológica com polissacarídeos obtidos de *Gayralia oxysperma*, Ropelatto (2011) obteve novas frações polissacarídicas a partir da extração aquosa a 80 °C da alga seca e moída. Considerando ainda, que o processo de degradação de Smith realizado com a heteroramnana de *Gayralia oxysperma* gera fragmentos com massas molares menores e com uma maior proporção de grupamentos sulfatos, foram obtidas novas frações a partir desse processo, também com a finalidade de determinar a atividade antitumoral desses fragmentos de menor massa molar.

As heteroramnananas sulfatadas e seus produtos de menor massa molar apresentaram atividade antitumoral contra linhagens de glioma humano U373MG (astrocitoma grau III) e U87MG (astrocitoma grau IV ou glioblastoma). O trabalho realizado por Ropelatto (2011) será discutido com maiores detalhes adiante. Contudo, irá ser abordado primeiramente, o papel das vias de sinalização da proliferação celular no desenvolvimento do câncer e uma breve discussão sobre gliomas.

3.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR E CÂNCER

Uma célula recentemente gerada deve decidir se iniciará um novo ciclo de crescimento e divisão ou entrará em quiescência (G_0), sendo essa decisão influenciada por fatores de crescimento encontrados no ambiente celular. Quase todos os tipos de células normais não proliferarão a menos que sejam induzidas por fatores de crescimento mitogênicos. Alteração nas vias que estimulam ou inibem a proliferação celular podem dar origem a tumores (WEINBERG, 2008). Compostos com atividade antitumoral interagem com essas vias, as quais se encontram desreguladas nos processos cancerígenos. Assim, ao se estudar compostos com atividade antitumoral, é necessário conhecer as vias que controlam a proliferação e a sobrevivência celular.

3.4.1 Vias de sinalização das cascatas de sobrevivência celular

As cascatas de sinalização para a sobrevivência celular são importantes para que a célula possa superar ambientes estressantes e nocivos. Uma via de sobrevivência fundamental é a cascata da classe de enzimas fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), que envolvem receptores da tirosina quinase (RTKs). Entre os RTKs pode-se citar EGFRs (receptores para o fator de crescimento epidermal) e PDGFRs (receptores para o fator de crescimento plaquetário) (MCLENDON *et al.*, 2008; ENGELMAN, 2009).

Quando os RTKs são ativados, a proteína PI3K é translocada para a membrana plasmática e produz PIP_3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato) a partir de PIP_2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato). O acúmulo de PIP_3 recruta a proteína *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) e também a proteína AKT, a qual promove a sobrevivência celular por facilitar a translocação do fator nuclear κB (NF κB) que em seguida ativa a transcrição de genes relacionados com a proliferação e sobrevivência celular (KARIN *et al.*, 2002). O término da

sinalização da via PI3K-AKT ocorre por ação de uma fosfatase PIP₃ específica (*PTEN* nos humanos) que remove o fosfato na posição 3 do PIP₃ para produzir PIP₂, que não serve como um sítio de ligação para AKT (ou proteína quinase B), então, a cadeia sinalizadora é interrompida (NELSON; COX, 2005).

Outra via de sobrevivência celular que está envolvida com o desenvolvimento de vários tumores é a cascata das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), sendo uma das principais proteínas que iniciam essa via é a proteína G Ras, que é ativada pela sensibilização RTKs. Ras ativado recruta Raf para a membrana celular culminando na ativação da via das proteínas MAPK/ERK (quinase ativada por sinal extracelular) 1 e 2. Outros substratos citoplasmáticos são fosforilados e translocados para o núcleo onde atuam como fatores de transcrição, incluindo o NFκB e a proteína ligadora do elemento responsivo ao AMPc (CREB) (KRAKSTAD e CHEKENYA, 2010).

Um dos elementos chave da regulação da proliferação e sobrevivência celular é a proteína p53, codificada pelo gene *TP53* (*p53* em murinos). Diversas situações podem causar um rápido aumento nos níveis dessa proteína, como a falta de nucleotídeos no DNA, radiação UV, radiação ionizante, sinalização de oncogene, hipoxia e bloqueio de transcrição gênica (WEINBERG, 2008). A proteína responsável pela degradação de p53 é a Mdm2. Sinal de sobrevivência via PKB/AKT ativam Mdm2 que aumenta a degradação de p53. A sobrevivência ou morte celular é determinada pela combinação dos sinais iniciados por p53, que por sua vez, regula as proteínas alvo que estão envolvidas na parada do ciclo celular e reparo de DNA (SHAMSARA, 2009; CHEN, WANG e EL-DEIRY, 2010).

3.4.2 Ciclo celular

O ciclo celular é dividido em duas fases, sendo a primeira chamada fase S, quando ocorre a replicação dos cromossomos e a fase M, onde o material replicado é segregado em duas células-filhas iguais entre si. Entre essas duas fases existem intervalos (*gaps*) responsáveis pela regulação do ciclo, sendo que o primeiro, G1 antecede a fase S e o segundo, G2, antecede a fase M (JORDÃO E ANDRADE, 2005). Nesses intervalos, a progressão do ciclo celular é mediada através da ativação e desativação de quinases dependentes de ciclina (CDKs), sendo a transição para as diferentes fases controlada através da fosforilação de alvos específicos dessas quinases. CDKs só são ativas na presença de ciclinas, quando formam o complexo ciclina-CDKs e tem como função fosforilar proteínas chaves, dentre elas a proteína supressora de tumor do retinoblastoma (pRb) (ARELLANO e MORENO, 1997; JORDÃO e ANDRADE, 2005;).

A decisão da célula entre crescer ou quiescer é governada pelo estado de fosforilação de pRB. A hipofosforilação de pRB bloqueia a passagem pelo ponto de restrição enquanto que pRB hiperfosforilada permite tal passagem. Isto acontece por meio da ligação ou liberação dos fatores de transcrição E2F. Quando acontece a liberação de E2F este pode se associar a promotores de genes que codificam proteínas capazes de conduzir a célula da fase G1 para a fase S do ciclo celular. pRB hipofosforilada liga-se a E2F, enquanto que pRB hiperfosforilada as libera (HULLEMAN, 2005; WEINBERG, 2008).

Devido a esse importante papel, é de se esperar que os níveis de ciclinas sejam estritamente controlados. Existem duas classes de ciclinas, sendo a primeira pertencente à família do gene p21, as quais são ativadas pelo gene supressor de tumor p53 e promovem a inibição de CDK. A expressão de p21 inibe principalmente CDKs da fase G1/S e é responsável por se associar com o fator de replicação do DNA, inibindo sua replicação e diminuindo a quantidade de células encontradas em fase S. A segunda classe é a família

INK (inibidor de CDK4) e inclui p15, p16, p18 e p19 (HARPER e ELLEDGE, 1996).

Caso haja uma desordem metabólica ou algum dano genético na célula, p53 coordena respostas localizadas na célula para facilitar o reparo do dano e o ciclo celular não progride enquanto o dano não for reparado. Caso o dano não possa ser reparado, a célula entra em apoptose (WEINBERG, 2008).

As fases do ciclo celular e seus reguladores positivos e negativos estão esquematizados na figura 3.

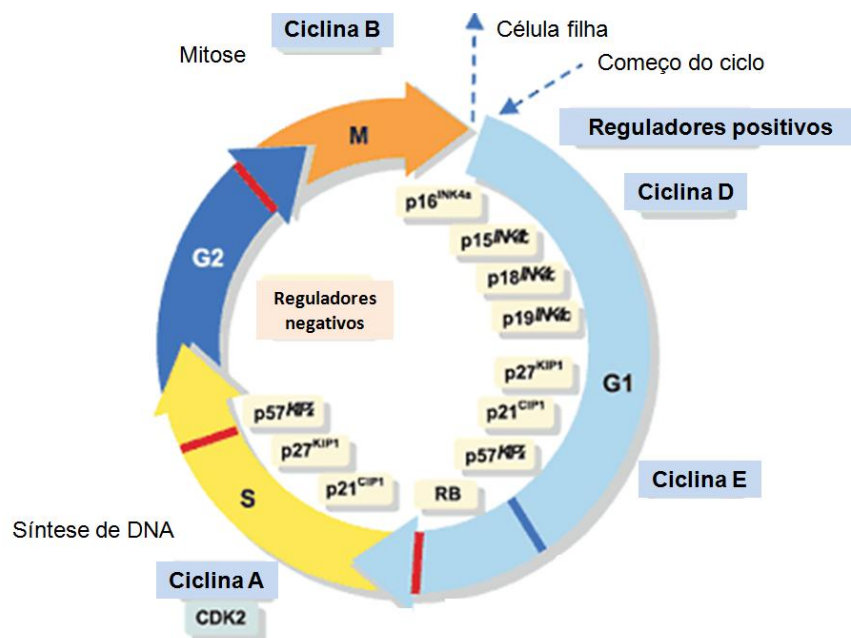


FIGURA 3 – FASES DO CICLO CELULAR E SEUS REGULADORES POSITIVOS E NEGATIVOS.

FONTE: adaptado de KONG et al., 2003.

NOTA: As CDKs estimulam a progressão do ciclo celular em suas diferentes fases. Ao longo dessas etapas, o ciclo pode ser interrompido, através da ação de reguladores negativos.

3.4.3 Apoptose

O termo apoptose foi introduzido por Keer *et al.* (1972) para designar mudanças morfológicas nas células, como permeabilização da membrana citoplasmática, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e perda da adesão celular, concomitantemente com a fagocitose dos restos celulares. Pode ocorrer de duas maneiras distintas: via extrínseca ou intrínseca. Ambas as vias levam a ativação de caspases, um grupo de proteínas quinases que fosforilam alvos específicos (KIECHLE e ZHANG, 1998; READ, 2000; MÜLLAUER *et al.*, 2001; ZIMMERMAN *et al.*, 2002).

A via intrínseca ocorre via mitocôndria através da liberação do citocromo c, que no citosol associa-se a outras proteínas (Apf e pró-caspase 9) para desencadear a cascata de eventos que culminarão a apoptose. A oncoproteína bcl-2 tem papel anti apoptótico e controla o fluxo do citocromo c por meio de canais especializados na membrana externa da mitocôndria, enquanto proteínas da mesma família e induzidos por p53 como bax e bad possuem a função oposta e promovem a liberação do citocromo c. Os membros pró e antiapoptóticos da família de proteínas bcl-2 atuam em função oposta, com cada parceiro tendo seu próprio antagonista (KIECHLE e ZHANG, 1998; READ, 2000; MÜLLAUER *et al.*, 2001; ZIMMERMAN *et al.*, 2002; WEINBERG, 2008).

Já a via extrínseca está relacionada com a ativação de receptores de morte por ligantes como citocinas e TNF- α , que levam a ativação das caspases. Os receptores que medeiam a apoptose são TNF-R1, FAS e DR4/DR5, aos quais se ligam, respectivamente, TNF α , CD95 e o fator de necrose tumoral relacionada com indução de apoptose ligando (TRAIL). A trimerização do receptor resulta no recrutamento de vários domínios de morte (DD) e resultam na ativação de caspase-8 e caspase-10. (LOCKSLEY *et al.*, 2001; AGGARWALL, 2003; WEINBERG, 2008).

As vias de sinalização que levam a sobrevivência e a proliferação celular encontram-se alteradas em muitos tumores, incluindo os gliomas.

3.5 GLIOMAS

Gliomas são tumores de origem neuroepitelial que podem ser derivados de astrócitos ou oligodendrócitos. Representam 31 % de todos os tumores cerebrais e 80,0 % dos tumores malignos do cérebro (ABTA, 2011).

O tipo de glioma mais comum é o astrocitoma, que representa 76 % de todos os gliomas (ABTA, 2011). Os astrocitomas são derivados de células astrocíticas e podem surgir nos hemisférios cerebrais, no tronco cerebral, medula espinhal ou cerebelo. Aparecem como áreas pálidas, pobremente definidas e gelatinosas no tecido nervoso, misturando-se ao tecido normal (STEVENS, 1998). Astrocitomas são classificados de acordo com uma escala que varia de I a IV, onde os tumores classificados como grau I tendem a ser benignos e os tumores de grau IV, os mais agressivos. Na fase III, é chamado também de astrocitoma anaplásico. Quando esse passa a apresentar necrose, o tumor passa a ser classificado como de grau IV e também pode ser chamado de glioblastoma multiforme (GBM) (ABTA, 2011). Metade dos gliomas são glioblastomas. Sua incidência é maior entre adultos de 45-55 anos e afeta mais homens que mulheres. Os astrocitomas anaplásicos são mais comuns em adultos jovens (ABTA, 2011).

Não existe prevenção e sua causa é incerta. Os principais sintomas são neurológicos focais e pressão intracraniana elevada. São comuns dores de cabeça, convulsões, perda de memória e mudanças de comportamento (ABTA, 2011).

A principal característica dos glioblastomas é o seu fenótipo invasivo e agressivo, sendo importante conhecer os mecanismos que levam a sobrevivência dessas células.

3.5.1 Vias de sinalização de glioblastomas

Os GBMs são classificados citogeneticamente em primários (ou *de novo*) e secundários. Os tumores primários se apresentam de forma aguda como um tumor de alto grau e atingem pessoas em torno de 60 anos. As mutações características desses tumores são nos genes EGFR, CDKN2A e *PTEN*. Os tumores secundários são comuns em pessoas de aproximadamente 45 anos e originam-se de um tumor de menor grau. Suas principais alterações são nos genes PDGRF e TP53 (PARSONS *et al.*, 2008; YAN *et al.*, 2009).

Uma importante alteração na sinalização dos glioblastomas é a via de p53 (codificada pelo gene *TP53*) que encontra-se alterada em 87 % dos casos, com mutação pontual em *TP53* em 35-40 % destes (MCLENDON *et al.*, 2008; PARSONS *et al.*, 2008)

São comuns também, alterações na via de sinalização da tirosina quinase. Atividade intrínseca de tirosina quinase e formas aberrantes destes receptores são encontradas nos glioblastomas, sendo a ativação constitutiva de EGFR foi detectada em 45 % das amostras de GBM (MCLENDON *et al.*, 2008). Um estudo imunohistoquímico mostrou que 91,3% de todos os GBMs possuem um nível de NFkB elevado, correspondente com a ativação de AKT (WANG *et al.*, 2004). Também foram encontrados 36 % de mutações no gene *PTEN* em GBM. A proteína *PTEN* é responsável pelo término da via PI3K-AKT, resultando em elevados níveis de PIP3 e portanto levando a hiperfosforilação de PDK1/AKT (MCLENDON *et al.*, 2008). Não foi identificada mutação somática do gene *AKT* em um painel de 109 amostras de GBM e 9 linhagens de astrocitomas (BLEEKER *et al.*, 2009), indicando que a ativação de AKT em GBM é mediada por mutação no gene *PTEN* que leva um aumento da atividade de AKT.

Alterações no receptor Ras, oncoproteína que induz a cascata de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), também é uma alteração frequente em GBMs (FELDKAMP *et al.*, 1999). Portanto, as vias PI3K/AKT e Ras/MAPK, de grande importância para a sobrevivência e crescimento celular, estão constitutivamente ativas em gliomas.

Assim como encontrado para os demais tipos de tumores, em GBMs é observado uma resistência á apoptose, a qual é provocada por uma desregulação dos genes que desencadeiam este processo, como por exemplo, a superexpressão de bcl-2 e bcl-x e uma diminuição na expressão de bax (WICK *et al.*, 1998; RUANO *et al.*, 2008).

3.5.2 Tratamento

O tratamento para astrocitomas de grau I é cirúrgico, que devido aos avanços das técnicas modernas, tem-se mostrado seguro aos pacientes. A partir do astrocitoma de grau II, são usadas quimioterapia e radioterapia, mas ainda assim, essa doença tem uma evolução muito rápida e a sobrevida de pacientes com o grau mais avançado da doença é de apenas 9 a 15 meses (figura 4) (MINNITI *et al.*, 2009; ABTA, 2011). A associação entre a quimioterapia e radioterapia em pacientes precocemente diagnosticados pode aumentar em cinco anos a sobrevida desses indivíduos em relação àqueles tratados apenas com radioterapia (STUPP *et al.*, 2005; STUPP *et al.*, 2009).

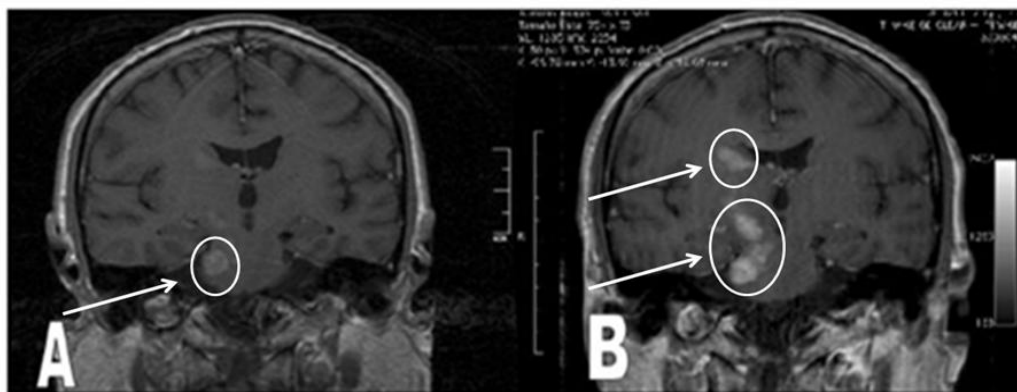


FIGURA 4 – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE UM PACIENTE DIAGNOSTICADO COM GLIOBLASTOMA MULTIFORME.

FONTE: adaptado de GUERRERO *et al.*, 2010.

NOTA- A- Raio-X de um paciente de 70 anos diagnosticado com glioblastoma multiforme. É possível observar a presença de uma pequena mancha branca. B- Raio-X do mesmo paciente após um mês de evolução. Nota-se um considerável aumento da região branca, correspondente ao tumor.

O quimioterápico de escolha para o tratamento de gliomas é a temozolamida (figura 5), uma droga precursora que *in vivo* é hidrolisada em 5-(3-metiltriazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC). Trata-se de um agente alquilante que causa dano citotóxico nas células em todas as fases do ciclo celular. Apresenta alta citotoxicidade provocando náuseas e vômitos além de outros efeitos adversos como mielossupressão, hepatotoxicidade, alopecia, rubor facial, neurotoxicidade e reações dermatológicas (NAJMAN e GADELHA, 2002; BRUTON *et al.*, 2006).

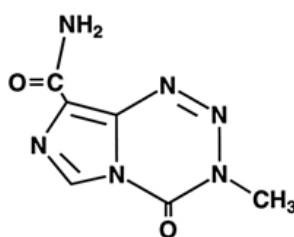


FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DO QUIMIOTERÁPICO TEMOZOLAMIDA

Considerando que prognóstico para GBMs é baixo, e ainda o fato que os tratamentos atuais são bastante agressivos, torna-se necessário a busca de novos tratamentos, visando melhorar a expectativa e a qualidade de vida destes pacientes. Uma classe de compostos que pode ser promissora são os

polissacarídeos sulfatados obtidos de macroalgas, por apresentarem atividade antitumoral em diferentes linhagens celulares (ZHOU *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2007; GALMAL-ELDEEN; AHMED e ABO-ZEID, 2009).

3.6 ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS

Vários estudos tem demonstrado a atividade antitumoral de diferentes tipos estruturais de polissacarídeos sulfatados obtidos de macroalgas em diversas linhagens de células, sendo a maioria deles realizados com polissacarídeos obtidos de macroalgas pardas (ZHOU *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2007; GALMAL-ELDEEN; AHMED e ABO-ZEID, 2009).

Galactofucanas sulfatadas contendo unidades de fucose 3- ligada obtidas das macroalgas pardas *Saccharina japonica* e *Undaria pinnatifida* diminuíram a viabilidade de células de linhagens SK-MEL-28 (melanoma), mama (T47D), cervical (HeLa), PC-3 (câncer de próstata), A549 (câncer de pulmão) e HepG2 (hepatoma humano). A linhagem A549 e as células HeLa mostraram-se mais sensíveis ao tratamento com o polissacarídeo (SYNYTSYA *et al.*, 2010; VISHCHUK *et al.*, 2011). Células HeLa também se mostraram sensíveis ao tratamento com heterofucanas sulfatadas isoladas da macroalga parda *Dictyopteris delicatula*, apresentando até 91,8 % de diminuição na viabilidade celular no tempo de 24 horas e na concentração de 2 mg/mL (MAGALHÃES *et al.*, 2011).

Linhagens tumorais AGS (de câncer gástrico) se mostraram sensíveis ao tratamento com polissacarídeos sulfatados obtidos de macroalgas vermelhas do gênero *Porphyra*. O tratamento dessas células por 24 horas com diferentes concentrações do polissacarídeo (0,01, 0,1, 0,25 e 0,5 %) diminuiu a viabilidade celular pelo método do MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) entre 20 a 60 % de maneira

dose-dependente. O estudo demonstrou que a ação antitumoral desse polissacarídeo envolve a indução a apoptose (KWON e NAM, 2006).

Fucanas sulfatadas obtidas de diferentes espécies de algas pardas mostraram-se capazes de induzir a apoptose em diferentes linhagens celulares, sugerindo que esse é o principal mecanismo pelo qual essas moléculas exercem sua atividade antitumoral (HYUN *et al.*, 2009; KIM *et al.* 2010; ALE *et al.*, 2011).

Fucanas sulfatadas obtidas de diferentes macroalgas pardas induziram a apoptose em células HT-29, HCT-5, HCT116 (câncer de cólon) e B16 (melanoma de murino). A redução na viabilidade das linhagens HT-29 e HCT116 atingiu 36,1 % na concentração de 20 µg/mL no tempo de 72 horas e 62 % para a linhagem HCT-5 na dose de 100 µg/mL durante o mesmo período de tratamento. A redução na viabilidade celular da linhagem de melanoma foi de 20 % quando tratada com 100 µg/mL de polissacarídeo durante 24 horas. (HYUN *et al.*, 2009; KIM *et al.* 2010; ALE *et al.*, 2011). Esses polissacarídeos induziram a apoptose através da ativação de caspases. Essa ativação foi atribuída ao aumento da expressão de fatores pró-apoptóticos e diminuição dos fatores antiapoptóticos tanto da via intrínseca quanto da via extrínseca (KWON e NAM, 2006; HYUN *et al.*, 2009; KIM *et al.* 2010; ALE *et al.*, 2011).

Ainda, há relatos que fucanas sulfatadas podem induzir a apoptose por uma via independente de caspases. Costa *et al.* (2011), investigaram o mecanismo de ação antitumoral de heterofucanas em células HeLa e observaram que na concentração de 1,5 g/L, essas são capazes de induzir a apoptose pelo aumento na expressão de glicogênio sintase quinase β (GSK) e do Fator Indutor de Apoptose (AIF). Esses fatores promovem a apoptose sem a necessidade de ativação de caspases.

Indução de parada de ciclo celular foi observada para os polissacarídeos da macroalga vermelha *Schizymenia dubyi*, os quais inibiram o crescimento celular de linhagens de carcinoma broncopulmonar de células não pequenas (NSCLC-N6) na fase G1 do ciclo, e para polissacarídeos de *Sargassum latifolium*, que além de induzirem apoptose, inibiram a proliferação celular de

linhagens 1301 de leucemia linfoblástica na fase S (BOURGOUGNON *et al.*, 1994; GALMAL-ELDEEN; AHMED e ABO-ZEID, 2009).

Além de possuírem significativa atividade antitumoral *in vitro*, polissacarídeos sulfatados obtidos de diferentes gêneros de macroalgas também possuem atividade *in vivo* (FERNÁNDEZ *et al.*; 1989; SOUZA *et al.*, 2007).

Galactanas sulfatadas constituídas predominantemente de unidades β -D-galactopiranosil 3-ligada sulfatada em C-6 e unidades de 3,6-anidro α -L-galactopiranosil 4-ligada foram obtidas da macroalga vermelha *Gracilaria domingensis*. Neste estudo, camundongos receberam previamente um tratamento com o polissacarídeo (15-60 mg/kg) em solução salina via intraperitônio durante 5 dias. Depois de duas horas de suspensão do tratamento foi implantado no peritônio desses animais células de carcinoma ascítico de Ehrlich. Foi observado um aumento na sobrevida dos animais que receberam o tratamento prévio com o polissacarídeo em relação ao grupo controle (FERNÁNDEZ *et al.*; 1989). Polissacarídeos sulfatados obtidos da macroalga parda *Sargassum vulgare* quando administrados via oral em camundongos na dose de 50 e 100 mg/m²/dia, ocasionaram diminuição no tamanho do tumor sarcoma 180 (SOUZA *et al.*, 2007).

Alguns destes estudos *in vivo* sugerem que a atividade antitumoral de polissacarídeos também pode estar relacionada com um aumento na resposta do sistema imune (ZHOU *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2012).

Carragenanas de baixa massa molar obtidas da macroalga vermelha *Chondrus ocellatus* e polissacarídeos obtidos de *Sargassum fusiforme* provocaram um aumento nesta resposta, pois foi observado um aumento na produção de TNF- α em ratos que receberam o tratamento com o polissacarídeo. No estudo com *Chondrus ocellatus* ainda foi observado um aumento na proliferação dos linfócitos. Já os polissacarídeos de *Sargassum fusiforme* provocaram um aumento na produção IL-1 por macrófagos e na

concentração da enzima superóxido dismutase (SOD) (ZHOU *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2012).

O aumento na concentração de (SOD) está relacionado com a atividade antioxidante, portanto, polissacarídeos sulfatados também poderiam retardar a evolução do tumor ou até mesmo prevenir o câncer como consequência da atividade antioxidante destas moléculas (CHEN *et al.*, 2012). Frações polissacarídicas obtidas da macroalga parda *Sargassum latifolium* inibiram a atividade da enzima CYP1A (que desempenha um papel de ativador da carcinogênese), ativaram enzimas do sistema antioxidante, como GSTs e apresentaram atividade anti-inflamatória, indicando que essas frações apresentam uma possível atividade preventiva contra o câncer, já que há evidências que a inflamação tem um papel crucial no processo de carcinogênese (SURH e KUNDU, 2007; GAMAL-ELDEEN; AHMED e ABO-ZEID, 2009). Interessantemente, uma fração polissacarídica obtida da mesma macroalga não apresentou atividade antioxidante e antiinflamatória, porém, foi capaz de induzir apoptose em células 1301 (leucemia linfoblástica). Não foram feitas análises estruturais para justificar as diferenças observadas na atividade biológica (GAMAL-ELDEEN; AHMED e ABO-ZEID, 2009).

3.6.1 Relação estrutura química e atividade

A relação estrutura química atividade biológica dos polissacarídeos descritos anteriormente polissacarídeos não é totalmente conhecida, porém sabe-se que a proporção do grupamentos sulfato influencia na atividade biológica (HAROUN-BOUHEDJA *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2011).

Há descrito na literatura que quando fucanas sulfatadas quimicamente são administradas em diferentes concentrações apresentaram uma maior redução na viabilidade de células AGS *in vitro* (37,3-68,0 %) quando comparadas com fucanas sulfatadas nativas (19,2 – 57,5 %) (CHO *et al.*,

2011). Já o contrário, a dessulfatação dessas moléculas reduz drasticamente a sua atividade biológica (HAROUN-BOUHEDJA *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2011). Outros estudos evidenciam a importância do grupamento sulfato na atividade antitumoral. Células HeLa apresentaram diminuição na viabilidade celular quando tratadas com frações polissacarídicas obtidas da macroalga vermelha *Amansia multifida* nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL durante 24 e 48 horas. A única fração que apresentou atividade em todas as condições de tempo e concentrações testadas foi a com maior teor de grupamentos sulfato (19,6 %), chegando a 43,5 % na dose de 100 µg/mL em ambos os tempos (SOUZA *et al.*, 2012).

Polissacarídeos com diferentes massas molares obtidos de *Sargassum pallidum* diminuíram a viabilidade de células de hepatoma humano HepG2, câncer de pulmão A549 e câncer gástrico MGC-803, sendo que a fração que apresentou maior atividade foi a com maior teor de grupos O-sulfato e menor massa molar, sendo esta variável, outro fator que pode influenciar a atividade antitumoral de polissacarídeos (YE *et al.*, 2008).

Frações polissacarídicas da macroalga parda *Laminaria japonica* diminuíram a viabilidade das linhagens celulares A375 de melanoma humano e BGC823 de carcinoma humano gástrico entre 5 a 30 % na concentração de 125 µg/mL. A fração purificada por DEAE-25 cuja massa molar observada foi de 80 kDa apresentou maior citotoxicidade em relação ao extrato bruto. Esse aumento da atividade foi relacionado com a maior quantidade de ramnose desta fração (PENG *et al.*, 2012).

Porém, nem sempre uma menor massa molar resulta em uma maior atividade biológica. Cho *et al.* (2011) obtiveram diferentes frações a partir de fucanas da macroalga *Undaria pinnatifida* por hidrólise parcial. A fração que apresentou maior redução na viabilidade de células AGS foi a com massa molar entre 5-30 kDa, intermediária quando comparada com as outras duas frações testadas, as quais possuíam massa molar maior que 30 kDa e menor que 5 kDa (CHO *et al.*, 2011). Resultado semelhante foi obtido por Yang *et al.* (2008) ao testar a viabilidade das fucanas sulfatadas obtidas desta mesma

espécie de macroalga e seus produtos de hidrólise em linhagens A549, de câncer de pulmão.

Fucanas sulfatadas isoladas de *Fucus evanescens* e seus produtos de degradação, obtidos através de auto-hidrólise, mostraram diminuir a viabilidade de linhagens de melanoma SK-MEL5 e SK-MEL28. Porém, foi observado que o extrato bruto possuía maior atividade em relação aos produtos de hidrólise. Tal fato foi relacionado com o baixo grau de sulfatação dos produtos de degradação (ANASTYUK *et al.*, 2011).

Assim, é descrito na literatura que a atividade antitumoral de polissacarídeos depende tanto da proporção dos grupamentos sulfato como da massa molar.

3.6.2 Atividade antitumoral de polissacarídeos obtidos de macroalgas verdes

Embora a atividade antitumoral de polissacarídeos obtidos de algas pardas e vermelhas tenham sido investigadas, para as verdes esses estudos são escassos.

Ramnanas sulfatadas obtidas da macroalga verde, *Monostroma nitidum*, contendo além de ramnose, ácido urônico, glucose e xilose, diminuíram a viabilidade de células de carcinomas humanos gástrico (AGS) e cervical. A redução foi de 35,0 a 75,4 % para a linhagem AGS, porém, menos que 40 % para as células HeLa (KARNJANAPRATUM e YOU, 2011).

Células AGS também apresentaram diminuição da viabilidade ao tratamento com manoxilanas sulfatadas, isoladas da macroalga verde *Capsosiphon fulvescens*, com Cl_{50} de 2,5 mg/ml. Esse polissacarídeo apresentou reduzida diminuição na viabilidade de linhagens celulares não tumorais IEC-6 (células epiteliais pequenas de intestino de rato) e FHs 74

(células epiteliais pequenas de intestino humano), mesmo na concentração de 5 mg/ml (KWON e NAM, 2007). Essas manoxilanas foram capazes de induzir a apoptose nas células tumorais através da inibição de IGF-I, o que levou a inibição da via PI3K/Akt. Foi observado também, um aumento na expressão de moléculas pró-apoptóticas como Bad e caspase-3 e inibição das anti-apoptóticas como bcl-2. (KWON e NAM, 2007). Assim, o mecanismo pelo qual esses polissacarídeos exercem a sua atividade antitumoral parece estar relacionado com a habilidade das células AGS em responder ao IGF-IR (KWON e NAM, 2006; KWON e NAM, 2007). Portanto, pelo exposto, polissacarídeos sulfatados isolados de macroalgas marinhas são moléculas que desempenham atividade contra diferentes tipos de células tumorais. Esses dados serão apresentados resumidamente na tabela 3.

3.6.3 Atividade antitumoral de heteroramnanas sulfatadas obtidas de *G. oxysperma*

Estudos conduzidos no laboratório de Química de Carboidratos – Algas Marinhas por Ropelatto (2011) demonstram a atividade antitumoral de heteroramnanas sulfatadas obtidas da macroalga verde *Gayralia oxysperma*, as quais mostraram-se capazes de diminuir a viabilidade celular de linhagens de glioma humano U373MG de astrocitoma – Grau III e U87MG de astrocitoma – Grau IV pelo método do MTT. Os testes foram realizados com frações de polissacarídeos denominadas:

- 1- OX-6: Frações brutas reunidas obtidas a partir de cinco extrações aquosas sequenciais a 80 °C por 4 horas
- 2- OX-6S: Produto de degradação controlada de Smith obtido a partir de OX-6.
- 3- OX-6Sb: Fração obtida a partir de OX-6S após eluição com NaCl 1 mol/L em DEAE-Sephacel.

TABELA 3 – ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS

Filo	Algas ^a	Características do Polissacarídeo	Modelo usado	Redução da viabilidade	Mecanismo de atividade antitumoral
PHAEOPHYTA	¹ <i>Dictyopteris delicatula</i>	Galactoramnanas 14,1 a 19,0 % de SO ₃ ⁻	Células HeLa- 100 a 2000 µg/ml por 24 horas	91,8 % (2 mg/ ml)	-----
	² <i>Fucus evanescens</i>	Fucanas sulfatadas 28,0% de SO ₃ ⁻	SK-MEL 5 e SK-MEL 8-100 a 800 µg/ml por 24 horas	Até 40 %.	-----
	^{3,4} <i>Fucus vesiculosus</i>	³ Urônicos= 19 a 123 e SO ₃ ⁻ = 342 a 348.	B16-100 a 1000 µg/ml por 24 horas	Até 80 %	-----
		⁴ Fucanas (Sigma – St. Louis, MO, U.S.A.)	HCT-5- 1 a 100 µg/ml por 72 horas	49,8 %-30 µg/ml	Apoptose
	⁵ <i>Laminaria japonica</i>	12,7 % de SO ₃ ⁻ Rha;Fuc;Man= 36,3; 18,4; 15,7	BGC823 e A375- 31,25 a 2000 µg/ml por 20 horas	15% (A375) e 25 % (BGC823)- 125 µg/ml	-----
	⁶ <i>Saccharina japonica</i>	10,0 a 23,0 % de SO ₃ ⁻	T-47D e SK-MEL 28	19 % (T47D) e 21 % (SK-MEL 28)– 200 µg/ml, 48 horas	-----
	⁷ <i>Sargassum filipendula</i>	Heterofucanas	Células HeLa- 100 a 2000 µg/ml por 24, 48 e 72 horas	32,7 a 72,5 %	Apoptose
	⁸ <i>Sargassum fusiforme</i>	Não informado	A549 <i>in vivo</i> - camundongos Balb/c-100 e 200 mg/Kg/dia de polissacarídeo por 28 dias	48,14 e 52,07 % de redução do tumor	Aumento da resposta imune
	³ <i>Sargassum henslowianum</i>	Galactofucanas	B16-100 a 1000 µg/ml por 24 horas	Até 80 %	-----
	⁹ <i>Sargassum latifolium</i>	Não informado	1301- 5 a 50 µg/ml	Até 70 %	Apoptose e parada de ciclo (fase S)
	¹⁰ <i>Sargassum pallidum</i>	Não informado	HepG2, A549 e MGC-803- 125 a 1000 µg/ml por 48 horas	1000 µg/ml: 62,2 % (HepG2), 64,8 % (A549), 79,6 % (MGC-803)	-----
	¹¹ <i>Sargassum vulgare</i>	Alginatos	Sarcoma 180 <i>in vivo</i> - camundongos Swiss- 50 e 100 mg/m ² / dia VO ou IP por 7 dias	27,3 a 88,8 %- redução no tamanho do tumor	Aumento da resposta imune

Continuação...

<i>Undaria pinnatifida</i>	¹⁵ Fucanas	HT-29 e HCT116- 5 a 20 µg/ml por 24, 48 e 72 horas	HT-29- 64,9 %; HCT116- 36,7 %- 20 µg/ml, 72 horas	Apoptose
	¹² Galactofucanas acetiladas 3-ligadas	Células HeLa, Pc-3, A549 e HepG2- 100 a 800 µg/ml por 24 horas	50 % (PC-3); 30% (Hela); 40% (A549), 70% (HepG2)	-----
	¹³ Fucanas 41,5 % de SO ₃ ⁻	A549- 200 a 1000 µg/ml por 48 horas	14,9 a 75,9 %	-----
	¹⁴ Fucanas sulfatadas 31,7 a 56,8 % de SO ₃ ⁻	AGS tratada com 200, 400, 600 e 800 µg/ml de polissacarídeo	19,2 a 68,0 %	-----
RODOPHYTA	¹⁶ <i>Chondrus ocellatus</i>	λ-carragenana de baixa massa molar (15 kDa) 27,8 % de SO ₃ ⁻	H-22 <i>in vivo</i> - camundongo ICR tratados com 25 e 100 mg/Kg/dia VO	35,73 e 43,97 % de redução do tumor
	¹⁷ <i>Porphyra sp.</i>	Não informado	AGS tratada com 0,01 a 0,5% por 24 horas	20 a 60 %
	¹⁸ <i>Gracilaria domingensis</i>	Galactanas sulfatadas	Carcinoma ascítico de Erlich <i>in vivo</i> - camundongos IBF tratados com 15 a 60 mg/kg de polissacarídeo	Aumentou a sobrevida dos animais
	¹⁹ <i>Schizymenia dubyi</i>	33,7 % de urônicos Xyl;Man;Glc= 1,6; 1,3; 3,3 %	NSCLC-N6 tratada com 1 a 150 µg/ml por 48, 96 e 144 horas	Paradas de ciclo (fase G1)
CHLOROPHYTA	²⁰ <i>Capsosiphon fulvescens</i>	28,7 % de SO ₃ ⁻ Xyl;Man= 85,0; 15,0 %	AGS tratada com 0-5mg/ml por 24 horas	CI 50= 2,5 mg/ml
	²¹ <i>Monostroma nitidum</i>	Não informado	AGS, Hela tratadas com 125 a 500 µg/ml por 72 horas	35,0 a 75.4 % (AGS) e menor que 40 % (Hela)

^aO número ao lado esquerdo da espécie de alga corresponde a referência bibliográfica, ----- = não determinado, * = mol%, ** = dados em proporção molar, *** = mg/g, Fuc = fucose, Rha = ramnose, Gal = galactose, Glc = glucose, glcA = ácido glucurônico, man = manose, xyl = xilose, ara = arabinose, TNR = terminal não redutor. Ref = 1- MAGALHÃES *et al.*, 2011, 2- ANASTYUK *et al.*, 2011, 3- ALE *et al.*, 2011, 4- HYUN *et al.*, 2009, 5-PENG *et al.*, 2012, 6-VISHCHUK *et al.*, 2011, 7- COSTA *et al.* 2011, 8- CHEN *et al.*, 2012, 09- GARMAL-ELDEEN; AHMED e ABO-ZEID, 2009, 10- YE *et al.*, 2008, 11-SOUZA *et al.*, 2007, 12-SYNTSYA *et al.*, 2010, 13-YANG *et al.*, 2008, 14- CHO *et al.*, 2011, 15-KIM *et al.* 2010, 16-ZHOU *et al.*, 2006, 17-KWON e NAM, 2006, 18-FERNÁNDEZ, *et al.*, 1989, 19- BOURGOUGNON *et al.*, 1994, 20-KWON e NAM, 2007, 21-KARNJANAPRATUM e YOU, 2011.

FONTE: O autor, 2013.

1- OX-6Sc: Fração obtida a partir de OX-6S após eluição com NaCl 1,5 mol/L em DEAE-Sephacel

A viabilidade celular foi avaliada em ambas as linhagens usando as concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Nas condições de concentrações e tempo mencionadas anteriormente, a linhagem U373MG apresentou diminuição na viabilidade celular de 17,7-31,5 %; 30,7-50,7 %; 24,1-27,3 % e 24,0-54,7 % quando tratadas com as frações OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc, respectivamente. Não foi verificada atividade citotóxica para nenhuma das frações na menor concentração e no menor tempo (24 horas e 10 µg/mL). Foi observada uma relação dose-dependente para as frações OX-6, OX-6S e OX-6Sc, sendo que OX-6S e OX-6Sc se mostraram mais eficazes na redução da viabilidade frente a linhagem U373MG.

A linhagem U87MG foi mais sensível ao tratamento com o polissacarídeo nas mesmas condições citadas anteriormente, apresentando redução na viabilidade celular entre 36,7-81,7 %, 54,9-67,7 %, 37,2-64,8 e 51,2-78,7 % para as frações OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc, respectivamente. Assim como verificado para a linhagem U373MG, a redução da viabilidade foi dose-dependente, porém neste caso, as frações mais citotóxicas foram OX-6 e OX-6Sc considerando todos os tempos e concentrações avaliados.

A fração OX-6Sc mostrou maior citotoxicidade para ambas as linhagens. Esta possui maior massa molar (251 kDa) e maior teor de sulfato (41%) quando comparada com OX-6Sb (massa molar de 109 kDa e 34 % de teor de grupos sulfato).

Como citado anteriormente, o grau de sulfatação influencia na atividade antitumoral do polissacarídeo. Estudos demonstram que polissacarídeos sulfatados apresentam redução na atividade antitumoral com a remoção dos seus grupamentos sulfato (HAROUN-BOUHEDJA *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2011). Porém, no estudo realizado por Ropelatto (2011) foi observado que a fração obtida após degradação controlada de Smith (OX-6S), cujo conteúdo de grupos O-sulfato é semelhante ao

encontrado para a fração OX-6Sb (34,3 %) apresenta maior atividade que esta para ambas as linhagens. Ainda, a fração OX-6 que possui apenas 25,7 % de grupamentos sulfato também, se mostrou mais citotóxica que OX-6Sb para a linhagem U87MG. Assim, esse estudo sugere que não é somente o teor de grupos sulfato que influenciam a citotoxicidade, mas também o posicionamento desses grupos na moléculaa massa molar, entre outros fatores.

Com a finalidade de entender quais as diferenças estruturais entre as duas frações homogêneas OX-6Sb e OX-6Sc que exercem influência na atividade antitumoral, foram conduzidas análises químicas (metilação) e espectroscópicas (RMN mono e bidimensionais) dos polímeros sulfatados e dessulfatados, além da determinação da massa molar. Os resultados da análise de metilação obtidos por Ropelatto (2011) estão apresentados na tabela 4.

TABELA 4- UNIDADES PRESENTES NAS FRAÇÕES NATIVAS OX-6Sb E OX-6Sc DE ACORDO COM OS DADOS DE METILAÇÃO

Unidade ^a	Frações	
	OX-6Sb	OX-6Sc
Ramnose como TNR	3,0 ^b	3,0
Ramnose como TNR 4-sulfato	3,0	2,0
Unidades 3-ligadas		
Ramnose 3-ligada	15,3	8,4
Ramnose 3-ligada 2-sulfatada	17,4	13,6
Ramnose 3-ligada 4-sulfatada	12,1	18,4
Ramnose 3-ligada 2,4-sulfatada	3,5	3,1
Unidades 2-ligadas		
Ramnose 2-ligada	4,7	2,1
Ramnose 2-ligada 4-sulfatada	13,7	11,2
Ramnose 2-ligada 3,4-sulfatada	4,7	11,1
Pontos de ramificação		
Ramnose 2,3-dissubstituída	5,6	6,4
Ramnose 2,3-dissubstituída 4-sulfatada	6,2	7,1
Unidades de ácido glucurônico		
Ácido glucurônico 4-ligado	3,0	4,6
Ácido glucurônico 4-ligado 2-sulfatado	2,8	3,1
Ácido glucurônico como TNR ^c	1,0	1,5
Glucose 4-ligada	1,0	--

NOTA: --= não detectado; ^ade acordo com os dados obtidos pela metilação das frações carboxi-reduzidas e carboxi-reduzidas e dessulfatadas e percentagens obtidas de *G. oxysperma* por Cassolato *et al.* (2008); ^bmol % dos monossacarídeos quantificados na forma de alditóis acetato parcialmente metilados; ^capenas entre os produtos de metilação das frações dessulfatadas.

FONTE: ROPELATTO (2011)

Os dados da tabela 4 mostram que ambas as frações são constituídas por diferentes tipos de unidades de ramnose 3- e 2-ligadas na relação de 2:1 e 1,8:1, respectivamente, com pontos de ramificação formado por unidades de ácido glucurônico 2-ligado, 2-ligado 4-sulfatado, glucose 4- ligada e ainda ramnose como terminal não redutor.

A principal diferença observada entre os produtos de degradação controlada de Smith está do posicionamento dos grupos sulfato nas unidades de ramnose 2-ligadas. A fração OX-6Sc apresenta 11,1 % de unidades de ramnose 2-ligadas 3,4-sulfatadas, enquanto que para a fração OX-6Sb esse valor é de 4,7 %. Outra diferença que se pode destacar é que a fração OX-6Sb é constituída por ~53 % de unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2 enquanto a fração OX-6Sc apresenta ~53 % de unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-4.

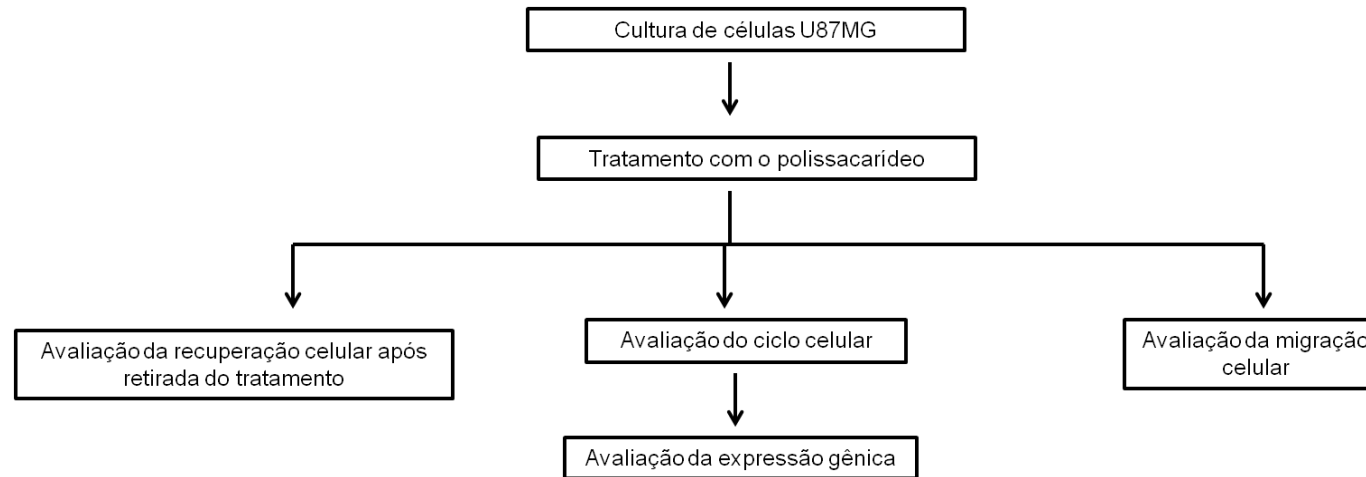
Assim, em termos estruturais, a fração OX-6Sc se diferencia principalmente da fração OX-6Sb por ser constituída por maiores percentagens de ramnose 2-ligada 3,4-sulfatadas (2,4:1), bem como unidade de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas (1,5:1) (razões obtidas através da análise de metilação) (ROPELATTO, 2011).

Em relação as, unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas, estes pontos de ramificação nas frações OX-6Sb e OX-6Sc podem estar não substituídos em C-4 ou sulfatados em C-4. Ainda, podem ser correspondentes a unidade de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2.

Assim, considerando que as heteroramnanas de *Gayralia oxysperma* e seus produtos de menor massa molar possuem atividade antitumoral contra linhagens de glioma humano, o objetivo do presente trabalho é investigar o mecanismo pelo qual esses polissacarídeos exercem essa atividade. Considerando ainda a importância de conhecer a relação estrutura química e atividade biológica, uma nova abordagem da análise de metilação da fração OX-6Sc será realizada. Ainda, novas frações de menores massas molares serão obtidas e caracterizadas quimicamente, com o objetivo de verificar a reprodutibilidade do processo de fracionamento dos produtos de degradação controlada de Smith.

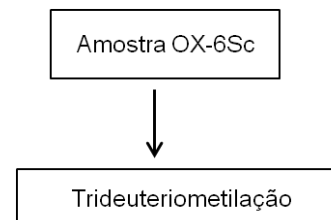
4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

4.1 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL DE HETERORAMNANAS SULFATADAS OBTIDAS DE *GAYRALIA OXYPERMA*

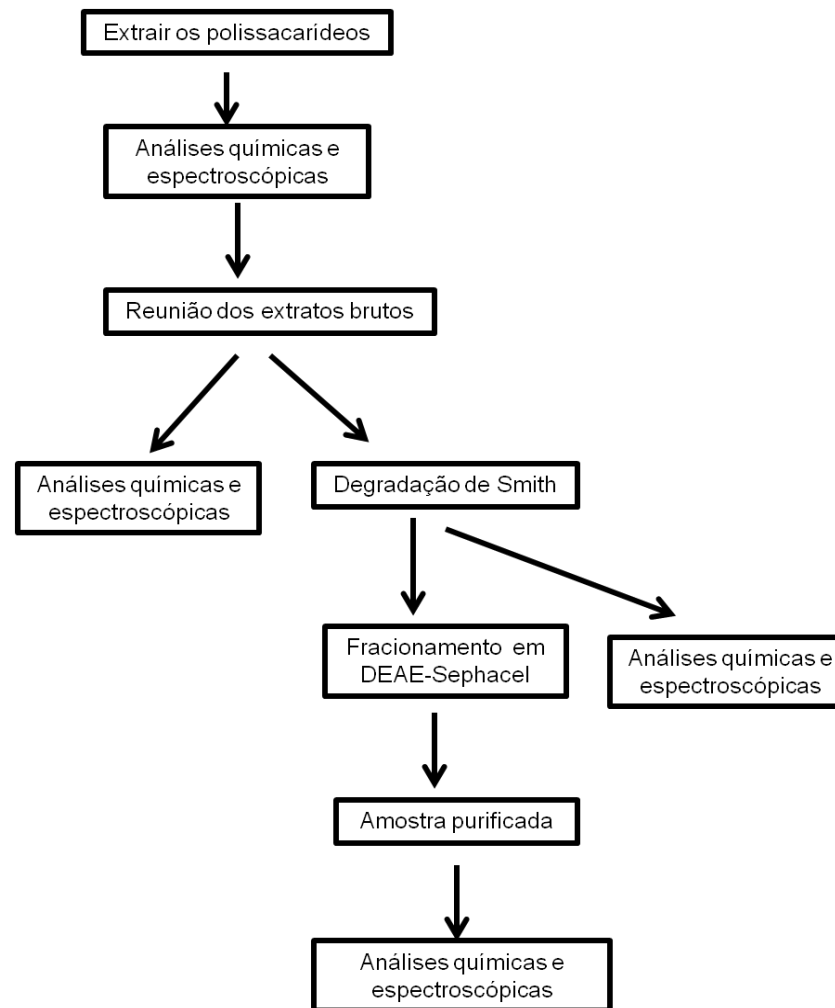


Frações usadas para a determinação do mecanismo da atividade antitumoral: OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc

4.2 DETERMINAÇÃO DO POSICIONAMENTO DOS GRUPOS SULFATO



4.3 OBTENÇÃO DE NOVAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DE MENOR MASSA MOLAR



5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vitro* DAS HETERORAMNANAS DE *G. oxysperma*

O mecanismo de atividade antitumoral foi determinado utilizando as frações OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc, obtidas por Ropelatto (2011). A concentração e o tempo utilizados nesse estudo foram de 100 µg/ml e 48 horas respectivamente. Essas condições foram escolhidas de acordo com os dados prévios de viabilidade celular.

5.1.1 Procedimentos, soluções, meio de cultura e linhagens celulares

5.1.1.1 Esterilização dos materiais

Todos os materiais e vidrarias utilizados para os procedimentos de cultivo de células (frascos para soluções e meio de cultura, equipamento para filtração de soluções, tampas, ponteiras plásticas para pipetas automáticas e pipetas de vidro) foram esterilizados em autoclave da marca Fanem a 120 °C, durante 40 minutos e sob pressão de 1 atm. Após o processo de esterilização, o material foi colocado para secar em estufa Fanem (Modelo Orion 505) a 50 °C.

5.1.1.2 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o DMEM (Dulbocco's Modified Eagle's Medium) alta gluucose (Cultilab), reconstituído em água ultra-pura e com pH ajustado em 7,4. O ajuste do pH do meio foi realizado pela adição de NaHCO₃ estéril (autoclavado) e

o tamponamento do meio foi realizado utilizando HEPES (Sigma Aldrich). O meio foi esterilizado por filtração em membrana de celulose com poro de 0,22 μm sob pressão em aparelho Sartorius, em câmara de fluxo laminar vertical (VECO). Para os experimentos, o meio DMEM alta glucose foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino estéril (SFB – Cultilab) e 50 $\mu\text{g/mL}$ do antibiótico gentamicina (Neo Química).

5.1.1.3 Linhagens celulares

Para a avaliação dos mecanismos de atividade antitumoral, foi utilizada a linhagem U87MG de glioblastoma humano – grau IV (POTEN; MACYNTIRE, 1969).

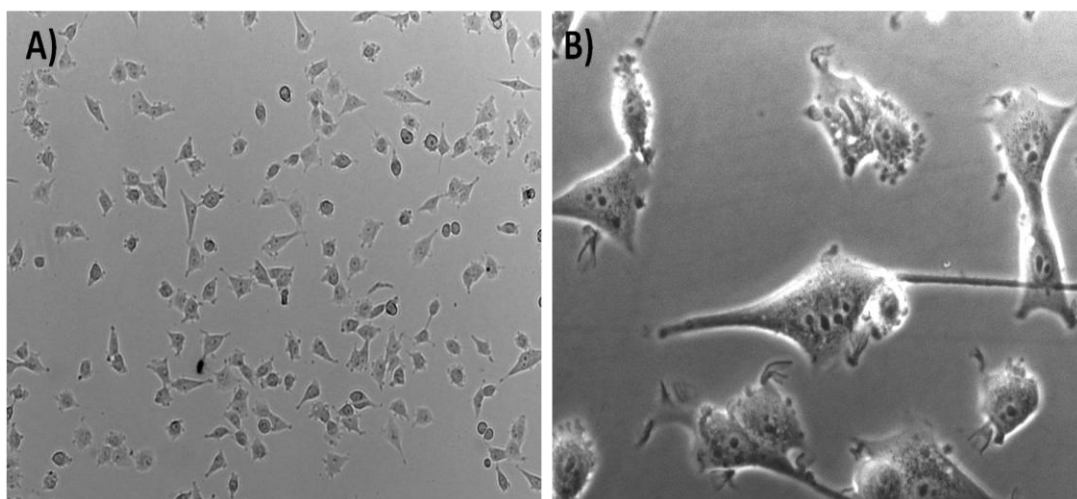


FIGURA 6 – LINHAGEM U87MG DE GLIOBLASTOMA HUMANO

FONTE: O autor, 2013.

NOTA: A- aumento 100 X; B- aumento 400 X.

5.1.1.4 Condições de cultivo

As células de glioma foram cultivadas *in vitro* como culturas aderentes em garrafas plásticas de poliestireno estéreis da Techno Plastic Products (TPP) em meio DMEM alta glucose suplementado com 10 % de SFB e gentamicina (150 μL

para 120 mL de meio). As células foram mantidas em estufa da marca Sanyo sob atmosfera contendo 2,5 % de CO₂ e temperatura de 37 °C.

5.1.1.5 Solução de tripsina-EDTA

A solução de tripsina-EDTA, utilizada na coleta das células, é constituída de 137 mmol/L de NaCl, 5,4 mmol/L de KCl, 5 mmol/L de glucose, 0,42 mmol/L de Na₂HPO₄, 0,44 mmol/L de KH₂PO₄, 2,3 mmol/L de NaHCO₃, 0,53 mmol/L de EDTA e 50 mg % de tripsina, com o pH ajustado para 7,4. O indicador de pH é o vermelho de fenol 15 mg/L. Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana estéril com poro de 0,22 µm (Millipore) sob pressão em aparelho Sartorius, em câmara de fluxo laminar vertical (VECO) e armazenada a - 20°C.

5.1.1.6 Solução Salina Tamponada (PBS)

A solução de PBS, utilizada na lavagem das células durante o procedimento de coleta, é constituída por 39,74 g de NaCl, 1 g de KCl, 5,75 g de Na₂HPO₄ e 1 g de KH₂PO₄, com o pH ajustado para 7,4 e volume completado para 1000 ml. A solução foi submetida a esterilização em autoclave nas condições anteriormente mencionadas e armazenada em temperatura ambiente ou a 4 °C.

5.1.1.7 Solução Salina Balanceada de Hank (HBSS)

A solução de HBSS é formada por 10 ml de cada uma das soluções “A” e “B”, completando o volume com água miliQ para 100 ml. A solução “A” é constituída por 80 g de NaCl, 4 g de KCl, 1,4 g de CaCl₂ e 2 g de MgSO₄. Já a solução “B” é formada por 0,6 g de Na₂HPO₄, 0,6 g de K₂HPO₄ e 10 g de glucose. Essas quantidades são para 1000 ml de ambas as soluções.

5.1.1.8 Preparação das frações polissacarídicas para o ensaio biológico

As frações OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc foram solubilizadas em água miliQ na concentração de 5 mg/mL e filtradas em filtro estéril de 0,22 µm em capela de fluxo laminar. Essas soluções foram armazenadas em caixa para tubos criogênicos em freezer -20 °C. Foi realizada a dosagem de açúcares totais das frações filtradas de acordo com Dubois *et al.* (1956) para ajuste das concentrações de polissacarídeos desejadas. A concentração utilizada para as análises foi de 100 µg/mL de polissacarídeo (em termos de açúcar total) dissolvido em meio DMEM alta glucose suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibiótico (gentamicina).

5.1.1.9 Solução Tampão hipotônico de iodeto de propídeo (IP)

A solução desnaturante de iodeto de propídeo (IP) foi preparada em 200 mL de PBS usando 50 µg/mL de IP (a partir de uma solução estoque 1 mg/mL de IP dissolvido em água ultra-pura); 0,1 % m/v de citrato de sódio; 0,1 % v/v de Triton X-100, sendo armazenado a 4°C ao abrigo da luz. Como essa solução contém triton, a membrana citoplasmática torna-se mais permeável, permitindo a entrada do IP, o qual por sua vez, intercala o DNA da célula. Na hora do uso, foi adicionado 0,1 % v/v de RNase.

5.1.2 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Foram plaqueadas 5×10^4 células em placas de 12 poços (volume total = 1mL) em meio DMEM alta glucose suplementado com 10 % de SFB e antibiótico (gentamicina). Após 24 horas em estufa para adesão das células, o sobrenadante foi

removido e as células tratadas com 2 mL das frações polissacarídicas OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc dissolvidas no meio de cultura na concentração de 100 µg/mL durante 48 (37°C sob atmosfera de 2,5 % de CO₂).

Decorrido esse tempo, foi procedida a coleta das células. Para tanto, o sobrenadante foi retirado e adicionado a um tubo fálcon de 15 mL (em banho de gelo) e as células foram lavadas com 1 mL de PBS, o qual também foi adicionado ao seu respectivo fálcon. Então, as células foram desaderidas com 200 µl de tripsina, sendo essa inativada com 1 mL de PBS contendo 10 % de SFB. A suspensão de células foi transefida para o fálcon. Então, os tubos foram centrifugados (5 minutos 3000 rpm, 4 °C), formando um *pellet* de células.

O sobrenadante foi descartado e em seguida foi realizado o procedimento de lavagem das células, para que não houvesse nenhum resquício de meio. As células foram ressuspensas em 1mL de PBS, centrifugadas (4 °C por 5 minutos e 4000 rpm) e o sobrenadante foi descartado. Esse procedimento foi realizado duas vezes e ao final da segunda centrifugação, as células foram marcadas com 300 µl de uma solução de iodeto de propídio desnaturante (descrito no item 5.1.1.9), transferidas para um tubo de citometria e permaneceram durante 15 minutos protegidas da luz.

Ao término deste processo, as células foram analisadas por citometria de fluxo no aparelho FACScalibur(BD) e as análises foram feitas usando um histograma (eixo X: filtro FL2, eixo Y: números de eventos) pelo software WinMDIversion 2.9 (desenvolvido por Joseph Trotter, disponível na Web).

5.1.3 Avaliação da recuperação celular após a retirada do tratamento (avaliação do efeito citotóxico e/ou citostático)

Para verificar se as células são capazes de recuperar a sua capacidade de proliferação após a retirada do tratamento, foi realizado o teste de recuperação celular através do método *in vitro* do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-

Difeniltetrazolio (MTT), o qual determina a viabilidade celular através de ensaio colorimétrico (MOSSMANN, 1983).

Para tanto, as células foram plaqueadas em duas placas de 96 poços diferentes, cada uma com densidade de 1×10^4 células/poço e volume final de 200 μ L em cada poço. Após 24 horas de adesão, as células de ambas as placas foram tratadas com as frações do polissacarídeo na concentração de 100 μ g/mL, e incubadas por 48 horas em estufa a 37°C e 2,5 % CO₂.

Decorrido esse tempo, foi realizado o teste do MTT para uma das placas. Para tanto, o meio de cultura foi removido com o auxílio de uma micropipeta e adicionado 200 μ L de MTT em solução de HBSS (0,5 mg/mL). A placa foi incubada por 3 horas em estufa e após esse período o MTT que não reagiu foi retirado e adicionado 200 μ L de DMSO para dissolver os sais de formazan formados. A absorbância foi medida em leitor de microplacas (TECAN INFINITE M200) com filtro de 570 nm, utilizando como branco DMSO.

Já na outra placa foi retirado o meio e trocando por meio de cultura sem tratamento para todos os poços. Esta placa permaneceu em estufa a 37 °C e 2,5 % CO₂ por mais 48 horas (totalizando 96 horas). Após esse tempo, foi realizado o teste do MTT como descrito anteriormente para a primeira placa.

Em ambas as placas, a condição controle (100 % de viabilidade celular) corresponde às células mantidas somente com meio de cultura (que em nenhum momento receberam o tratamento com o polissacarídeo). Foram analisadas a relação da absorbância 96 horas X 48 horas. A análise estatística foi realizada através do software GraphPad PRISM 5.0 e os resultados submetidos à análise de variância ANOVA (fator único) e teste de Tukey para comparação das médias com nível de significância de $p < 0,05$.

5.1.4 Avaliação da migração celular

A avaliação da migração celular foi realizada baseando-se no protocolo descrito por LIANG; PARK; GUAN, 2002. A linhagem celular de glioma humano, U87MG, foi plaqueada em placas de plástico de 24 poços na densidade de 5×10^4 e incubadas em estufa a 37 °C sob atmosfera de 2,5 % de CO₂ até atingirem a máxima confluência. Decorrido esse tempo foi feito um risco contínuo pela superfície da placa com uma ponteira p200 e as células foram tratadas com 2 mL das frações de polissacarídeos na concentração de 100 µg/mL (dissolvidos em meio sem soro) por 24 e 48 horas. O ensaio foi analisado em microscópio de contraste de fase (Olympus CK2). A condição controle do experimento foi considerada como 100 % de migração.

5.1.5 Análise dos níveis de mRNA após o tratamento com as frações polissacarídicas OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc

5.1.5.1 Extração e purificação do RNA celular

Foram plaqueadas 1×10^6 células em placas p100, as quais foram armazenadas em estufa incubadas em estufa (37 °C sob atmosfera de 2,5 % de CO₂) por 24 horas e então tratadas com 100 µg/mL de polissacarídeo dissolvidos em meio de cultura durante 48 horas.

Decorrido esse tempo, o meio de cultura foi descartado e as células desprendidas com 800 µl tripsina e coletadas em um eppendorff o qual foi centrifugado por 5 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente. Então, foi procedida a lavagem do *pellet* formado durante a centrifugação das células. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão com 1 mL de PBS, o qual foi

submetido a uma nova centrifugação por 5 minutos a 4000 rpm. O procedimento de lavagem foi repetido por três vezes e ao final da última etapa as células foram armazenadas a -80 °C.

O mRNA celular foi extraído utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen), o qual utiliza a propriedade de ligação seletiva do RNA com mais de 200 nucleotídeos à membrana de sílica presente na mini-coluna.

Inicia-se o teste adicionado-se 353,3 µl do tampão RLT (β-mercapetanol/guanidina-tiocianato), que além de lisar as células inativa as RNases presentes na amostra, mantendo assim o RNA intacto. Após a lise celular o mRNA foi filtrado em uma mini-coluna (Kit) com o objetivo de remover os restos celulares e centrifugado a temperatura ambiente por 1 minuto a 11000 g.

Ao filtrado foi adicionado 350 µl de etanol 70 %, que precipita o mRNA, promovendo assim, condições adequadas para a ligação do RNA total à membrana de sílica da coluna. Então, esse lisado precipitado foi adicionado a esta mini-coluna (Kit), a qual foi centrifugada por 30 segundos a 8000 g sob temperatura ambiente. O eluído foi descartado e a coluna desalinizada através da adição de 350 µl de MDB (*Membrane Dessalting Buffer*).

O DNA presente na amostra foi inativado através da adição de 100 µl de uma solução de DNase (10 µl de Dnase + 90 µl de tampão de reação para Dnase) e então a coluna foi lavada para a remoção de metabólitos e restos celulares, restando na coluna o RNA purificado, o qual foi eluído. A quantificação foi feita através da medida de absorbância da amostra em 260 e 280 nm (Nanodrop 1000 – Thermo Scientific) e a integridade do RNA extraído foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1 %. Esta metodologia prevê um enriquecimento do mRNA, já que a maioria dos RNAs com menos de 200 nucleotídeos (como por exemplo, 5S rRNA, tRNA) são seletivamente excluídos.

5.1.5.2 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA utilizou as especificações da metodologia – ImProm II Reverse Transcription System (Promega), um kit convencional que inclui uma transcriptase reversa e um conjunto de reagentes projetados para a síntese de DNA a partir de um mRNA poli (A). Iniciou-se o teste preparando 6µl de uma solução contendo 1µg de RNA. O volume foi completado com água livre de RNase, adicionando em seguida 1 µl de oligo DT (primer). A solução permaneceu por 5 minutos a 70 °C no termociclador, o que causa a perda da estrutura secundária do RNA, possibilitando o anelamento do primer. Decorrido esse tempo, foi adicionado 13 µl de mix (4 µl de tampão RT, 3mg de MgCl₂, 1 µl mix dNTP, 3,5 µl de água RNase out, 0,5 µl de Rnasin – Inibidor de RNase- e 1 µl RT) e mantido no gelo por 5 minutos. Então, a amostra foi colocada novamente no termociclador, para que a síntese propriamente dita ocorra. Para tanto, foram usados os seguintes ciclos de temperatura: 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 1 hora e 70 °C por 15 minutos. Ao término deste processo, a solução de RNA foi diluída dez vezes com água livre de RNase e armazenado em freezer -20 °C.

5.1.3.3 Avaliação da modulação da expressão gênica

O cDNA sintetizado foi submetido a análise da expressão gênica utilizando a metodologia de PCR Quantitativo em tempo real (RT-qPCR). A reação de RT-qPCR foi realizada no equipamento Rotor-Gene Q (CorbettReserch) utilizando os reagentes do Rotor-Gene SYBR Green PCR kit (Qiagen) e indicadores dos genes p21, p19 e p53.

Iniciou-se a reação preparando uma mistura que teve um volume final de 18 µL constituída por: 4,5 µL de cDNA 1:30; 4,5 µL dos iniciadores F (*forward*) e R (*reverse*); e 9 µL de *Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix* (composto pela HotStarTaq Plus DNA polimerase; Tampão da polimerase; mistura de dNTPs; água

livre de RNase). Para realização das reações as amostras foram incubadas a 95 °C durante 5 minutos. Após este tempo, foram realizados cerca de 45 ciclos de amplificação para cada gene testado, sendo que as amostras ficaram 10 segundos a 95 °C e 20 segundos a 60 °C em cada ciclo. A dissociação foi realizada variando-se a temperatura de 60°C a 90 °C. Os valores de CT dos genes alvo foram representados como unidades relativas de expressão, normalizados pelo gene de controle interno *hGAPDH* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase).

5.2 DETERMINAÇÃO DO POSICIONAMENTO DOS GRUPOS SULFATO

A determinação do posicionamento dos grupos sulfato foi realizada com a fração OX-6Sc carboxi-reduzida (OX-6Sc-R), obtida por Ropelatto (2011). Para tanto, foi realizada uma nova abordagem na análise de metilação, a trideuteriometilação, com a finalidade confirmar os resultados previamente obtidos para a fração OX-6Sc.

5.2.1 Trideuteriometilação

A fração OX-6Sc carboxi-reduzida (OX-6Sc-R) foi submetida sequencialmente ao processo de metilação com ICH_3 (item 4.2.2), dessulfatação solvolítica (item 4.1.8) e remetilada utilizando iodometano trideuterado (ICD_3).

5.2.2 Análise de metilação

5.2.2.1 Preparo do Sal de Trietilamônio

Para realizar a análise de metilação do polissacarídeo sulfatado foi necessário primeiramente, tornar os polissacarídeos solúveis no solvente aprótico dimetil sulfóxido (DMSO). Para tanto, a amostra OX-6Sc previamente carboxi-reduzida (OX-6Sc-R) foi dialisada contra solução de trietilamina 5 % por 12 horas e em seguida congelada e liofilizada (STEVENSON e FURNEAUX, 1991).

5.2.2.2 Análise de Metilação

O processo de metilação dos polissacarídeos, na forma de sal de trietilamônio, foi conduzido de acordo com o método de CIUCANU e KEREK, 1984. Nesse método os polissacarídeos foram solubilizados em DMSO (1mL para cada 15 mg de polissacarídeo), e foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) pulverizado (30 mg) à solução. A mistura permaneceu sob agitação mecânica vigorosa por 30 minutos e decorrido esse tempo, foi adicionado iodometano (ICH_3) (0,1 mL para cada 15 mg de polissacarídeo) permanecendo sob agitação mecânica vigorosa por mais 30 minutos. Este processo (adição de NaOH e iodometano) foi repetido por mais duas vezes. A amostra foi dialisada contra água destilada (membrana de 6-8 kDa), congelada, liofilizada. O polissacarídeo permetilado foi hidrolisado com ácido fórmico 45 %, a 100 °C por 16 horas, sendo os produtos de hidrólise reduzidos com borohidreto de sódio (NaBH_4) por 12 horas. O excesso de NaBH_4 foi destruído pela adição de ácido acético, sendo o material liofilizado e acetilado com anidrido acético (1:1 v/v) por 1 hora a 120 °C. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por CLG-EM.

5.3 OBTENÇÃO DE NOVAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS

5.3.1 Posicionamento sistemático da espécie estudada

Super-Reino: Eucariota

Reino: Plantae

Sub-reino: Viridaeplantae

Filo: Chlorophyta

Classe: Ulvophyceae

Ordem: Ulvales

Família: Gayraliaceae

Gênero: *Gayralia*

Espécie: *Gayralia oxysperma* (Kützinger) K.L. Vinogradova ex Scagelet al.



FIGURA 7 – ASPECTO GERAL DA CLORÓFITA *G. oxysperma*

FONTE: <<http://www.marevita.org/>>. Acesso em 25/01/2012.

5.3.2 Coleta e processamento

Os exemplares da macroalga verde *Gayralia oxysperma* Vinogradova ex Scagel et al., foram coletados em agosto de 2010 na baía de Antônia- PR e cedidos pela professora Dra. Franciane Pellizzari da Universidade Estadual do Paraná (UEPR) Câmpus FAFIPAR.

A alga foi seca em estufa a 25-30 °C, moída em moinho de facas (ACB Labor) resultando em 23,6 g de alga seca e moída, a qual foi submetida a processos sequenciais de extração.

5.3.3 Extração dos polissacarídeos

A macroalga verde foi submetida ao processo de extração conforme descrito por Cassolato et al. (2008). Para tanto, a alga seca e moída (23,6 g) foi submetida à extração aquosa (5 % p/v) sequencial duas vezes a 25 °C e quatro vezes a 80 °C durante quatro horas sob agitação mecânica. Após cada etapa a alga foi centrifugada a 7700 X g por 20 minutos a 4 °C e o seu sobrenadante foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, precipitado etanol (3:1 v/v) e cloreto de potássio (KCl). Essa solução permaneceu em geladeira por aproximadamente 12 horas. Decorrido esse tempo, a solução foi centrifugada (7700 X g por 20 minutos a 4 °C) e o precipitado foi dissolvido em água e dialisado (membrana de 12-14 kDa) sob agitação magnética sequencialmente contra água destilada, contra NaCl para retirar o KCl (P.A.-A.C.S.) e novamente contra água destilada. Após a diálise a amostra foi centrifugada novamente (15000 X g por 5 minutos a 4°C) para retirar eventuais contaminantes. Por fim, o sobrenadante foi congelado e liofilizado e o precipitado armazenado. A biomassa restante foi armazenada em freezer a -20 °C.

As frações extraídas receberam o nome Go-1, Go-2, Go-3, Go-4, Go-5 e Go-6, sendo as duas primeiras as frações extraídas a 25 °C e as restantes a 80 °C.

5.3.4 Degradação Controlada de Smith

Para a realização da degradação controlada de Smith, os extratos brutos obtidos a 80 °C foram reunidos originando a fração OX-7, a qual foi solubilizada (1,8 g) em 175,8 mL de água destilada e 175,8 mL de m-NaIO₄ 0,1 mol/L (metaperiodato de sódio), obtendo-se uma concentração final de 0,05 mol/L de m-NaIO₄. A solução permaneceu no escuro por 72 horas, sob agitação mecânica e a temperatura ambiente. Decorrido esse período, foi adicionado 40 mL de etilenoglicol (para consumir o excesso de m-NaIO₄), sendo dialisada contra água destilada sob agitação magnética (membrana de 6 – 8 kDa), reduzida com NaBH₄ por 20 horas a temperatura ambiente, neutralizada com ácido acético até pH em torno de 5,0, dialisada sob agitação magnética contra água destilada (membrana de 6 – 8 kDa), congelada e liofilizada (GOLDSTEIN *et al.*, 1965).

A fração oxidada foi submetida a hidrólise ácida parcial com TFA 1 mol/L (10 mg de polissacarídeos/ mL de TFA 1 mol/L) por 20 horas a temperatura ambiente, sob agitação. Após esse período, a amostra foi neutralizada, dialisada contra água destilada (membrana de 6–8 kDa) e liofilizada (FURNEAUX e STEVENSON, 1990). A fração resultante foi identificada com adição da letra “S” (Smith) ao nome da fração original (OX-7S).

5.3.5 Métodos analíticos gerais

5.3.5.1 Determinação do teor de Carboidratos Totais

As dosagens de carboidratos totais foram realizadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico, descrito por Dubois *et al.*, 1956. O limite de quantificação do método é de 10-40 µg, sendo utilizado como padrão uma solução de ramnose (1 mg/mL), sendo a leitura realizada em 480 nm.

5.3.5.2 Dosagem de Proteínas Totais

As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu. O limite de quantificação do método é de 5-100 µg de proteína, sendo utilizado como padrão solução de BSA e a leitura realizada em 660 nm.

5.3.5.3 Dosagem de grupos Sulfato

Para a determinação dos teores de grupos sulfato presentes nos polissacarídeos, foi utilizado o método de Dodgson e Price (1962), o qual tem como reagente a mistura gelatina-bário. Inicialmente é feita uma hidrólise total do polissacarídeo (2-4 mg de polissacarídeo para 1ml de HCl 1 mol/L, 5 h, 105 °C), para que ocorra a liberação dos grupamentos sulfato em solução. Ao adicionar o BaCl₂, os grupos sulfatos livres reagem com o bário, formando um composto insolúvel, BaSO₄, que se mantém em suspensão devido a presença da gelatina

(Oxoid). O método é turbidimétrico, sendo a leitura realizada a 360 nm, apresentando limite de quantificação de 20–200 µg de sulfato. O padrão utilizado foi uma solução de sulfato de sódio diluído em HCl.

5.3.5.4 Dosagem do teor de ácidos urônicos

As dosagens de ácidos urônicos foram realizadas pelo método do *m*hidroxibifenila (FILISSETTI-COZZI e CARPITA, 1991). Este método apresenta limite de quantificação de 1-38 µg, sendo que a coloração é aparente após 5 a 10 minutos da adição dos reagentes e é estável por 1 hora. A leitura é realizada em 525 nm.

5.3.6 Métodos hidrolíticos

5.3.6.1 Hidrólise ácida total

Para determinação da composição monossacarídica, as frações foram submetidas à hidrólise ácida total (1 – 2 mg) utilizando TFA 1 mol/L por 4 horas a 100 °C. A reação foi interrompida adicionando-se 0,5 mL de água e a amostra foi congelada e liofilizada. Os monossacarídeos obtidos foram reduzidos adicionando-se NaBH₄ ou NaBD₄ (até pH 9-11) por 12 horas a temperatura ambiente e decorrido esse tempo a amostra foi neutralizada com ácido acético 1:1 até pH 5,0, congelada, liofilizada e co-destilada de três a cinco vezes com 0,5 mL de metanol para a remoção do ácido bórico na forma de borato de trimetila, que é volátil. A amostra foi acetilada com 0,5-1,0 mL de anidrido acético por uma hora em estufa a 120 °C e os acetatos de alditóis formados analisados por CLG-EM.

Os polissacarídeos permetilados foram submetidos à hidrólise ácida com ácido fórmico 45 % a 100°C por 16 horas, sendo os hidrolisados reduzidos com NaBH₄ ou NaBD₄ por 12 horas e acetilados com anidrido acético:piridina (1:1 v/v) por 12 horas a temperatura ambiente. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por CLG-EM

5.3.7 Métodos cromatográficos

5.3.7.1 Cromatografia de Troca Iônica (DEAE-Sephacel)

A fração OX-7S obtida a partir da degradação controlada de Smith foi solubilizada em água e fracionada por cromatografia de troca aniônica em coluna contendo DEAE-Sephacel. A amostra foi eluída primeiramente com água e em seguida com concentrações crescentes de NaCl (0,5; 0,75; 1,0, 1,25, 1,5; 1,75 e 2 M). As eluições foram monitoradas pelo teste colorimétrico do fenol- ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). As frações coletadas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, dialisadas em membrana de 6-8 kDa até a remoção do sal, congeladas e liofilizadas. As frações obtidas foram denominadas: OX-7Sw, OX-7Sa, OX-7Sb, OX-7Sc, OX-7Sd, OX-7Se, OX-7Sf e OX-7Sg.

5.3.7.2 Cromatografia Líquido-Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CLG-EM)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em um cromatógrafo da marca VARIAN 3800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25µm) DB-225 MS (Durabond), e um espectrômetro de massa do tipo IonTrap, marca Varian Saturn

2000R. A temperatura do injetor é de 250 °C e a temperatura inicial do forno de 50°C, seguido de aumento gradual de 40°C por minuto, até 220°C para acetato de alditol, e 210°C para alditol acetato parcialmente metilado, mantendo-se constante a partir de 25 e 30 minutos, respectivamente. Hélio foi utilizado como gas de arraste com fluxo de 1,0 mL/min. Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons de 70 eV, com m/z (relação massa/carga).

Os cromatogramas foram analisados e integrados em software Saturn Workstation 5.1. Esse método foi utilizado para quantificação relativa de acetatos de alditóis e acetatos de alditóis permetilados, sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons (JANSSON *et al.*, 1976).

5.3.7.3 Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão (HPSEC) Acoplada a Detector de Índice de Refração (IR) Diferencial e Espalhamento de Luz em multiângulos (MALLS)

Para análise de homogeneidade foram preparadas soluções dos polissacarídeos na concentração de 1 mg/mL em solução de nitrato de sódio (NaNO_3 0,1M) contendo azida de sódio (200 ppm) dissolvidas em água milliQ. As soluções obtidas foram filtradas em membranas MILLIPORE (acetato de celulose) de 0,22 μm e as análises realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração (IR) diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WAYTT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP, com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 (Colunas Ultrahydrogeltm 2000, 500, 250 e 120, respectivamente) em série e teve como eluente uma solução de nitrato de sódio (NaNO_3 0,1M) contendo azida de sódio (200 ppm), pressão de 920 psi a 20 °C.

5.3.8 Dessulfatação por Tratamento Solvolítico

5.3.8.1 Preparo do sal de piridínio

O processo de solvólise foi conduzido com os polissacarídeos na forma de sal de piridínio. Para formação deste sal, a fração OX-7Sd foi solubilizada em água e então foi adicionado resina catiônica DOWEX 50x8 na forma H^+ . Essa resina troca o Na^+ presente nos grupamentos sulfato desses polissacarídeos pelo íon H^+ , facilitando a formação do sal de piridíneo. A amostra permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente por 30 minutos, sendo então filtrada (pH do filtrado 1-2) e neutralizada (em capela) com piridina, até pH 7,0 e liofilizada (NAGASAWA, INOUE e TOKUYASU, 1979).

5.3.8.2 Solvólise

A fração na forma de sal de piridínio foi solubilizada em uma mistura de dimetilsulfóxido, metanol e piridina, na proporção de 89:10:1 (v/v), respectivamente, respeitando-se a relação de 10 mg de polissacarídeo para 3 mL da mistura (NAGASAWA, INOUE e TOKUYASU, 1979).

A solução resultante foi mantida a 100 °C durante 4 horas e decorrido esse tempo, dialisada contra água destilada, congelada e liofilizada. O polissacarídeo dessulfatado foi identificado pela adição da letra “D” (dessulfatado) ao nome da fração original (OX-7SdD).

5.3.9 Métodos espectroscópicos

5.3.9.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em tubos de 5 mm de diâmetro. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando acetona como padrão interno, tanto para as análises de ^{13}C (31,45 ppm) quanto para ^1H (2,225 ppm). As análises foram realizadas na temperatura de 70°C.

5.3.9.2 Técnicas de RMN Monodimensionais

a) Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – ^{13}C (RMN de ^{13}C)

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos na frequência base de 100,16 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas de 4.000 – 70.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. As amostras foram solubilizadas em D_2O , na concentração de aproximadamente 80 mg/mL.

b) Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN – ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz. As frações foram solubilizadas em D_2O , congeladas e liofilizadas (esse processo foi repetido no mínimo por três vezes). As amostras foram solubilizadas em D_2O pura (30 mg/mL).

5.3.9.3 Técnicas de RMN Bidimensionais

a) HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy)

Através desta técnica heteronuclear foi possível determinar quais átomos de hidrogênio (^1H) estão ligados aos respectivos átomos de carbono (^{13}C) a partir de sinais de ^{13}C conhecidos ou de ^1H já determinados. As condições de aquisição dos espectros de HSQC utilizadas foram conforme descritas no manual da Bruker. A resolução dos espectros foi de 1024 (F2) x 512 (F1) K, com janela espectral de 4085 (F2) x 15923 (F1) Hz.

b) COSY (Correlation Spectroscopy)

É uma técnica homonuclear que correlaciona os deslocamentos químicos dos núcleos de ^1H que estão acoplados um com o outro. Nos carboidratos o H-1 de um monossacarídeo apresenta acoplamento com o H-2 da mesma unidade, sendo possível observar esta interação na forma de um pico cruzado (*cross peak*) entre os mesmos sinais, quantificar esta interação através da determinação da constante de acoplamento (J) e ainda determinar o deslocamento químico do H-2 a partir do H-1. A partir do sinal de H-2, pode ser determinado o H-3 e assim sucessivamente ao longo do anel.

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vitro* DAS HETERORAMNANAS DE *Gayralia oxysperma*

6.1.1 Análise do Ciclo Celular

As células de glioma U87MG crescem em condições de cultivo *in vitro* como células aderentes ao substrato utilizado (garrafas plásticas de poliestireno). Nos estudos prévios de citotoxicidade realizados com as frações de heteroramnanas de *G. oxysperma*, realizados por Ropelatto (2011), não foi possível verificar através de microscópio óptico, indício de células mortas após o tratamento com o polissacarídeo, ou seja, não foram vistas células desaderidas da placa. Ao invés disso, foram observados que as culturas de células U87MG apresentavam uma menor confluência após o tratamento com os polissacarídeos. Essa observação sugere que os compostos em questão exercem sua ação inibindo a proliferação celular (ROPELATTO 2011).

Com o objetivo de confirmar estes resultados, foi avaliado a possível modulação pela heteroramnana sulfatada e seus produtos de menor massa molar, na progressão das células pelo ciclo celular, o qual permite avaliar a porcentagem de células em cada fase do ciclo, além de fornecer informações sobre células contendo DNA fragmentado (indício de apoptose).

Para tanto, as células U87MG foram tratadas com as seguintes frações de heteroramnanas sulfatadas obtidas de *G. oxysperma*: OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc (100 µg/mL por 48 horas) e após o período de tratamento foram coletadas e marcadas com iodeto de propídio, um intercalante de DNA. A fluorescência emitida pelo IP pode ser quantificada por de citometria de fluxo (FACS), gerando um gráfico

chamado histograma, no qual é possível identificar as diferentes fases do ciclo por meio de picos característicos (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1992).

Os histogramas podem ser delimitados por áreas dos picos (figura 8, representadas pelas regiões M1, M2, M3 e M4). A intensidade de fluorescência captada pela região M1 corresponde a quantidade de células que estão numa região denominada sub-G1, sendo a mesma caracterizada pela presença de células com DNA fragmentado. Presença de DNA fragmentado é indicativo de morte celular. A região M2 é referente às células que estão na fase G1 do ciclo, a região M3 corresponde a fase S, enquanto a região M4 corresponde às células que estão na fase G2-M do ciclo celular.

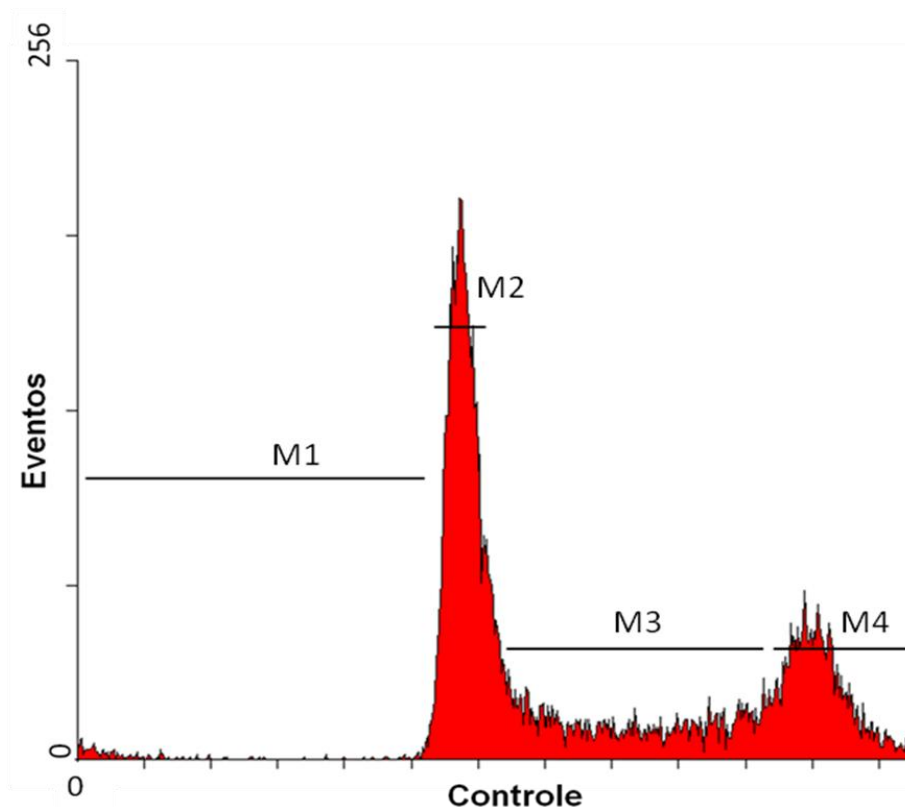


FIGURA 8: ANÁLISE DE CICLO CELULAR COM CÉLULAS U87MG.

NOTA: Histograma representativo da célula U87MG sem o tratamento. As regiões delimitadas M1, M2, M3 e M4 nas figuras correspondem a: M1 – região Sub-G1; M2 – fase G1 e, M3 – fase S, M4- fase G2-M.

Os resultados desta análise estão representados na figura 9. É possível observar um aumento significativo na proporção de células U87MG na fase G1 do ciclo celular quando estas são tratadas com as frações polissacarídicas OX-6, OX-6S e OX-6Sc. Para a fração OX-6Sb, não foi observado um aumento significativo na proporção de células em fase G1.

Foi possível verificar que não houve aumento na proporção de células em sub-G1 para nenhuma das frações, sugerindo que provavelmente o mecanismo pelo qual as heteroramnanas sulfatadas de *G. oxysperma* e seus produtos de menor massa molar exercem sua atividade antitumoral não envolve indução de morte celular. Assim, os resultados da análise de ciclo celular sugerem que as frações OX-6, OX-6S e OX-6Sc estão provavelmente inibindo a proliferação dessas células tumorais, ao invés de induzir sua morte.

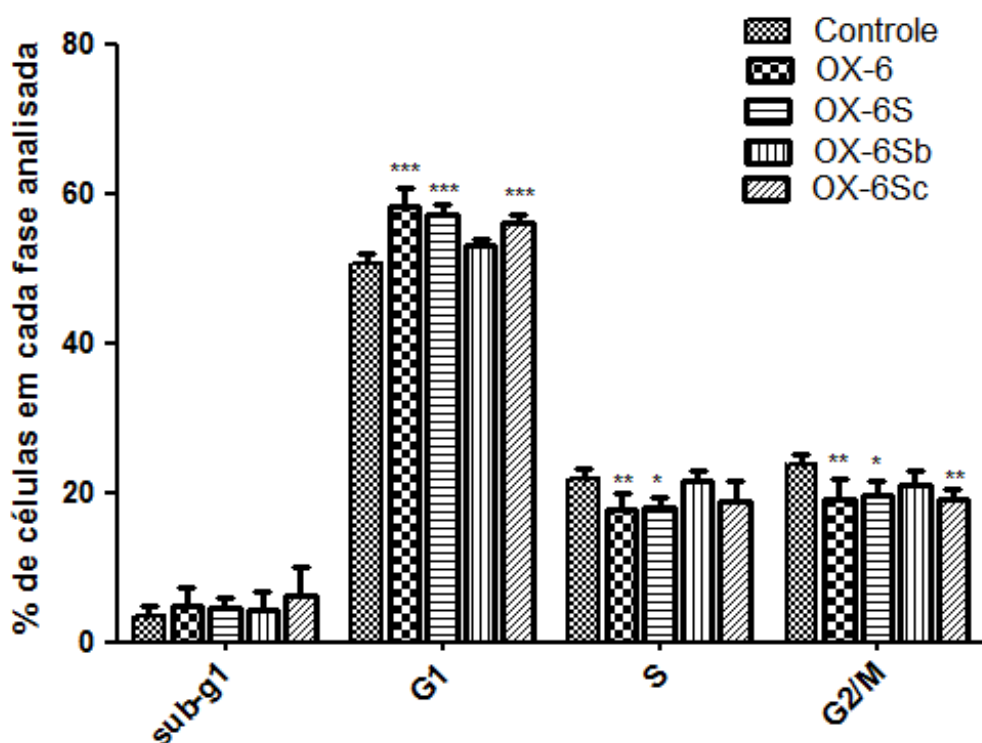


FIGURA 09 - PORCENTAGENS DE CÉLULAS U87MG NA DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES OX-6, OX-6S, OX-6SB E OX-6SC POR 48 HORAS

NOTA: Gráficos representativos de quatro experimentos independentes feitos em duplicatas. Two-way-ANOVA *** $p < 0,001$.

Portanto, a análise de ciclo celular corrobora com a hipótese levantada em estudos anteriores com as frações polissacarídicas de *G. oxysperma*. Assim como descrito por Ropelatto (2011), no presente estudo também não foram observados indícios de células mortas após o tratamento com as heteroramnanas sulfatadas.

6.1.2. Avaliação da Recuperação Celular

O ensaio do ciclo celular mostrou que os polissacarídeos de *G. oxysperma* e as frações de menor massa molar isolados de *G. oxysperma* apresentam atividade antiproliferativa, modulando a progressão das células através do ciclo celular. Para verificar se esse efeito é permanente, ou se após a retirada do tratamento a linhagem U87MG é capaz de voltar a proliferar normalmente, as células foram submetidas ao teste da recuperação celular, realizado através do método de MTT.

A linhagem U87MG foi plaqueada em duas diferentes placas e tratada com as frações polissacarídicas (concentração de 100 µg/mL) por 48h. Uma das placa foi imediatamente coletada após o término do tratamento, enquanto que a segunda placa foi mantida em cultura por 96h, permanecendo as 48h seguintes em meio de cultura padrão (contendo somente soro e antibióticos). Ao término de cada período de incubação, foi realizado o teste de viabilidade.

A avaliação da proliferação celular foi calculada considerando a condição controle (células mantidas apenas com o meio de cultura padrão por todo o tempo do experimento) como 100 %. Para avaliar se a célula recuperou a capacidade de proliferação após a retirada do tratamento, o resultado foi analisado comparando as razões das absorbâncias de 96 horas por 48 horas, sendo possível verificar então, a taxa de proliferação celular após a retirada do tratamento. A condição controle deste experimento corresponde a razão das absorbâncias das células que não receberam o tratamento com o polissacarídeo. A metodologia deste método está esquematizada na figura 10.

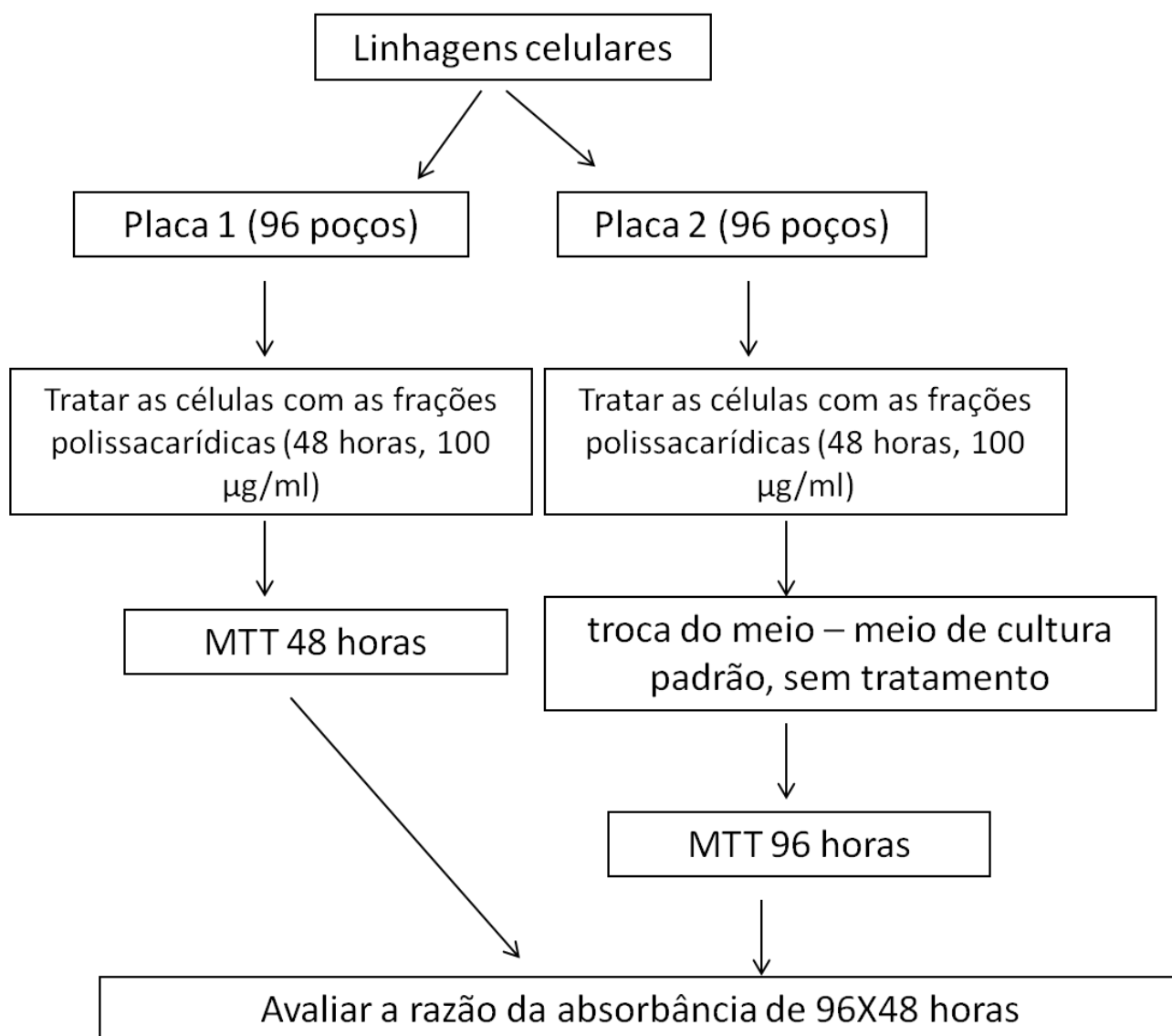


FIGURA 10 – ESQUEMA DO TESTE DE RECUPERAÇÃO CELULAR

A avaliação do número de células viáveis no tempo de 48 horas mostrou que todas as frações diminuíram significativamente a viabilidade celular da linhagem U87MG em relação a condição controle (figura 11). As frações OX-6 e OX-6S apresentaram 33,2 e 45,9 % de redução na viabilidade celular respectivamente. O perfil de citotoxicidade foi semelhante com o encontrado por Ropelatto (2011) no tempo de 48 horas e na concentração de 100 µg/ml. Não foram observadas diferenças estatísticas entre OX-6 e OX-6S, indicando que o perfil de citotoxicidade dessas frações é semelhante. As frações OX-6Sb e OX-6Sc reduziram a viabilidade celular em 18,6 % e 30,6 % respectivamente. Também não foi observado diferença

estatística entre essas duas frações. Foi observado diferença apenas entre as frações OX-6S e OX-6Sb.

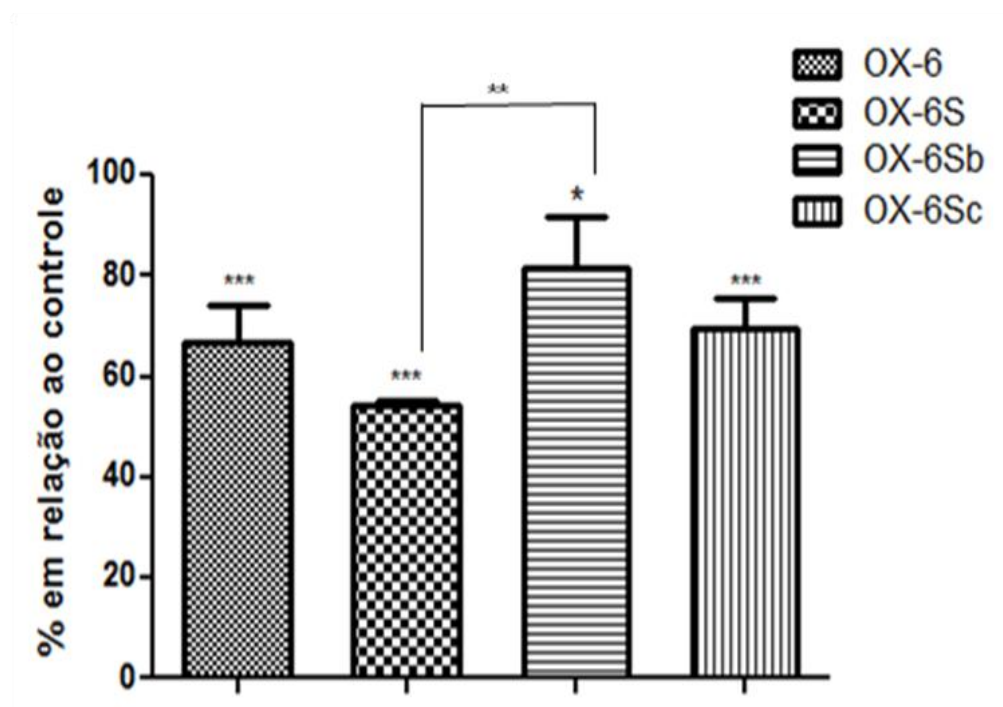


FIGURA 11 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG APÓS 48 HORAS DE TRATAMENTO COM 100 µg/mL DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc

NOTA: A condição controle é representada como 100 % de viabilidade. Os dados mostrados são relativos a 4 experimentos independentes realizados em quadriplicatas. A significância estatística mostrada é referente a condição controle [ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$].

Após 96 horas de tratamento foi avaliada a proliferação celular da segunda placa. A absorbância obtida no tempo de 96 horas foi então dividida pela obtida no tempo de 48 horas. Pode-se observar na figura 12 que todas as células que estavam sob o estímulo de parada de proliferação no tempo de 48 horas após a exposição das frações polissacarídicas voltaram a proliferar em intensidade equivalente que as células da condição controle, visto que não houve diferença estatística nas razões Abs96h/Abs48h das condições experimentais e a condição controle.

Assim, pode-se concluir que a linhagem U87MG é capaz de recuperar a sua capacidade de proliferação após a retirada do tratamento com o polissacarídeo. Estes resultados, em conjunto com os ensaios prévios de viabilidade e ensaios de

citometria de fluxo, corroboram nossa hipótese de que o tratamento das células de glioma humano com as heteroramnanas sulfatadas promove uma alteração da proliferação celular, levando a um aumento significativo do número de células na fase G1 do ciclo celular.

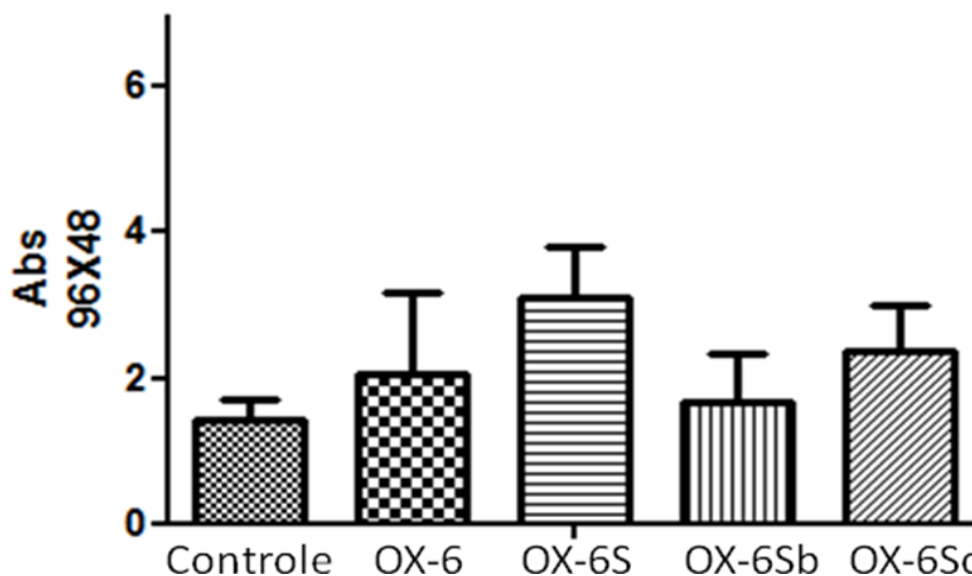


FIGURA 12 – RECUPERAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG APÓS 48 HORAS DA RETIRADA DO TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OX-6, OX-6S, OX-6Sb E OX-6Sc

NOTA: Recuperação da viabilidade das células U87MG após 48 horas da retirada do tratamento com 100 µg/mL de polissacarídeo no tempo de 48 horas de exposição. Estão plotadas as razões entre as absorbâncias obtidas nos tempos 96 / 48 horas, não havendo nenhuma diferença significativa entre os grupos. Os dados mostrados são relativos a 4 experimentos independentes realizados em quadruplicatas. A significância estatística mostrada é referente a condição controle [ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$].

6.1.3 Avaliação da migração celular

Dentre as características das células tumorais destaca-se a alta capacidade migratória. Baseado nisso, foi avaliado o efeito do polissacarídeo na migração celular através do teste desenvolvido por LIANG; PARK; GUAN, 2002 denominado *Scratch in vitro*. Para tanto, as células foram plaqueadas até atingirem uma alta confluência e então foi feito um “risco”, para retirada da camada de células de uma porção da placa, com o auxílio de uma ponteira p200 e as células foram tratadas com as frações polissacarídicas dissolvidas em meio sem soro. Assim, a migração

das células adjacentes em direção ao risco da placa pode observada ser através do microscópio. As micrografias estão apresentadas na figura 13.

Para esse estudo, as células U87MG foram tratadas com as diferentes frações de polissacarídeos na concentração de 100 µg/mL e a migração celular acompanhada nos tempos de 24 e 48 horas.

Normalmente para esse ensaio, é analisado o comprimento do risco e se ele diminui ou não conforme o tratamento. Esse método de análise não foi adotado para o presente trabalho porque foi observado que nas nossas condições experimentais houve um aumento no número de células nesta região.

Ao invés disso, portanto, foi determinada a quantidade de células presentes em uma área na região do risco de aproximadamente 257 mm² (aproximadamente 509 µm de largura e 505 µm de comprimento) nos tempos de 0, 24 e 48 horas. A contagem de células na condição controle foi considerada 100 %.

A partir das micrografias apresentadas na figura 13, é possível observar que nas condições experimentais, onde houve o tratamento das células U87MG com as diferentes frações polissacarídicas, a quantidade de células na região do risco foi menor no tempo de 48 horas, mas não no tempo de 24 horas.

A capacidade migratória foi normalizada pelo número de células viáveis em cada condição experimental, avaliado através do teste do MTT por Ropelatto (2011). A condição controle foi representada como possuindo uma taxa de migração de razão 1. As proporções de migração celular apresentadas para as frações OX-6, OX-6S, OX-6Sb e OX-6Sc para o tempo de 24 horas foram de 0,9, 1,1, 1,2 e 1,3 respectivamente, enquanto que para o tempo de 48 horas foram de 1,0, 1,2, 1,3 e 1,1 (figura 14). Não foram observadas diferenças estatísticas na capacidade migratória das células de glioma quando comparamos as condições contendo os diferentes tratamentos e a condição controle para nenhum dos tempos avaliados. Assim, é possível concluir que o polissacarídeo não afeta a capacidade de migração da célula U87MG.

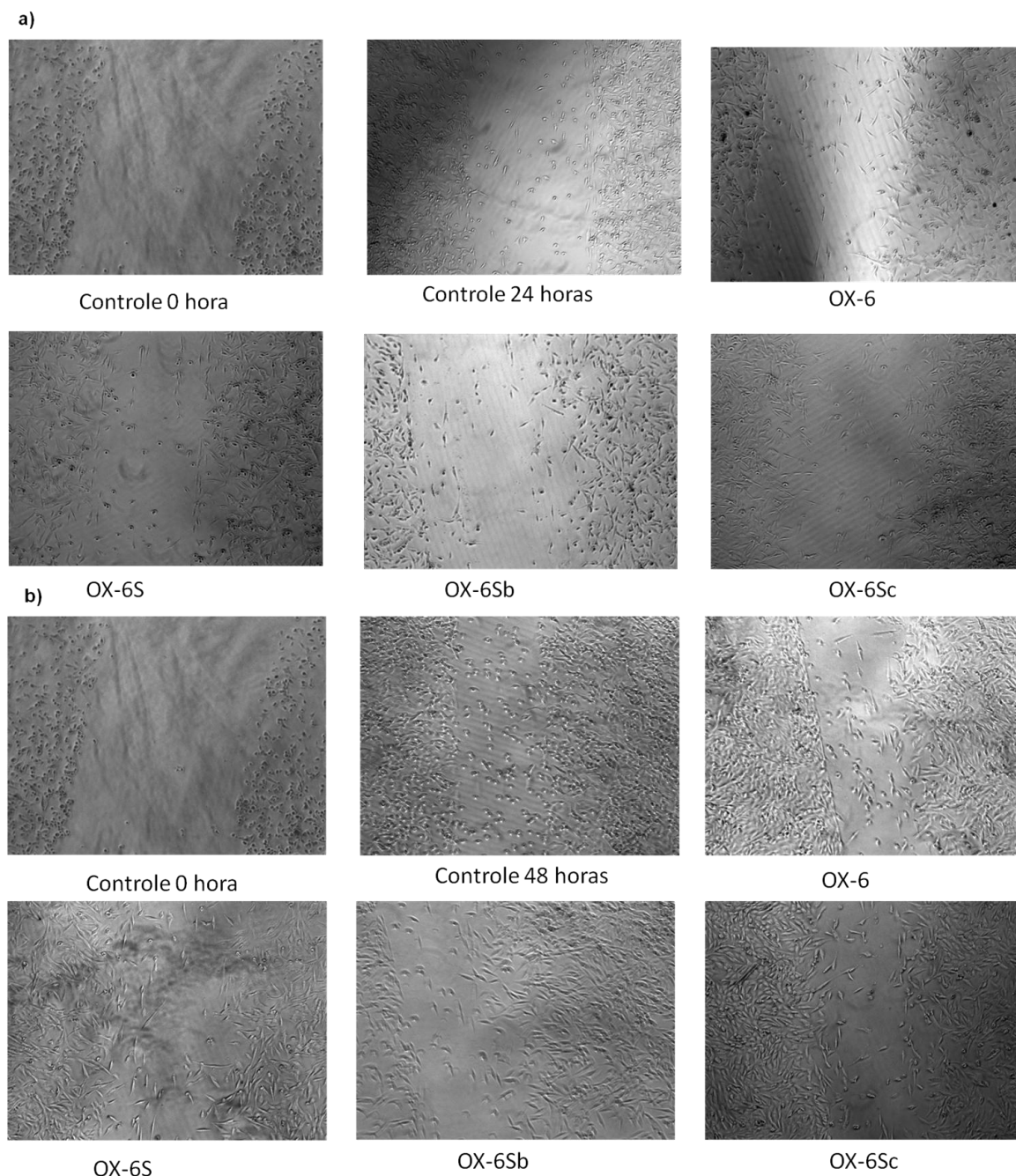


FIGURA 13- AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO DE *SCRATCH IN VITRO*

NOTA: Ensaio de *Scratch* das células U87MG. A) 24 horas, B) 48 horas. Micrografias representativas de quatro experimentos independentes feitos em duplicatas. Aumento de 50x.

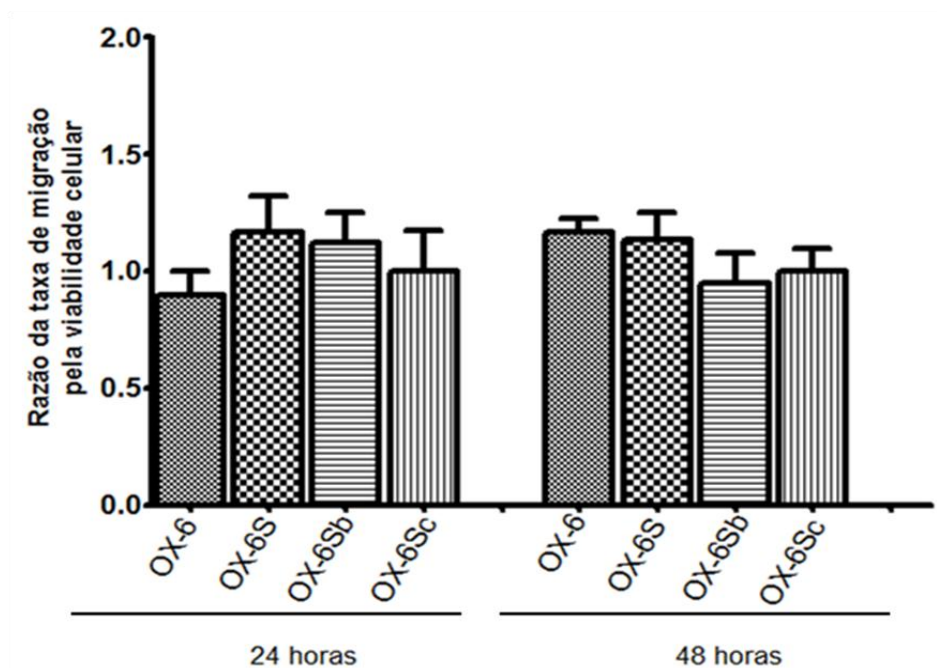


FIGURA 14 – ENSAIO DE SCRATCH DAS CÉLULAS DE GLIOMA U87MG APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OX-6, OX-6S, OX-6Sb E OX-6Sc

NOTA: Razão entre a porcentagem de células que migraram na direção do risco e a porcentagem de células viáveis, calculada através do teste de MTT. A avaliação da migração e da viabilidade celular foram realizadas após a exposição das células com 100 µg/mL do polissacarídeo durante 48 horas. Resultados correspondem a quatro experimentos feitos em duplicatas. ANOVA *** $p < 0,001$.

6.1.4 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE mRNA DE p21 APÓS O TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS

Os resultados obtidos demonstram que as heteroramnanas sulfatadas de *G. oxysperma* e seus produtos obtidos por degradação controlada de Smith modulam a progressão do ciclo celular induzindo um aumento da porcentagem de célula na fase G1. Com a finalidade de investigar mais detalhadamente como esses polissacarídeos exercem a sua ação, nosso próximo passo foi analisar a modulação da expressão de genes reguladores do ciclo celular nas células U87MG após o tratamento com as diferentes frações. Especificamente, analisando os marcadores p21, p19 e p53. A condição controle refere-se as células que foram mantidas apenas com o meio de cultura.

Primeiramente, o mRNA das células foi extraído, conforme descrito no item 4.13.1 da seção “Materiais e Métodos”. Os genes de interesse foram normalizados pela expressão constitutiva do gene de controle interno gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*hGAPDH*), gene constitutivamente ativo da via glicolítica.

Os dados estão representados na figura 15 mostram que houve aumento na expressão de p21 nas células U87MG após tratamento com as frações OX-6, OX-6S e OX-6Sc. Esse aumento foi de 132,9; 167,7 e 133,1 % para OX-6, OX-6S e OX-6Sc respectivamente. Já para a expressão do marcador p19, não foram observadas diferenças estatísticas entre as amostras e a condição controle.

Foi observado ainda, aumento na expressão de p53, indicando que a modulação do ciclo celular ocorre através da via p53/p21. A sobrevivência ou morte celular é determinada pela combinação dos sinais iniciados por p53, que por sua vez, regula as proteínas alvo que estão envolvidas na parada do ciclo celular. (SHAMSARA, 2009; CHEN, WANG e EL-DEIRY, 2010). As frações provocaram um aumento na expressão de p53 de 206,3; 177,4; e 172,6 % para as frações OX-6, OX-6S e OX-6Sc respectivamente.

A única fração que não apresentou aumento na expressão de p53 e p21 foi a fração OX-6Sb, o que está de acordo com o resultado do ciclo celular, em que não foi observado modulação do ciclo celular por essa fração. Apesar de não ter sido observado aumento na proporção de células na fase G1, nem aumento na expressão dos moduladores do ciclo celular para a fração OX-6Sb, esta apresentou uma redução na viabilidade de 18,6 %. A sugestão é que para a dose e o tempo avaliados, não é possível analisar o efeito de OX-6Sb nas células de glioma humano.

O aumento da expressão da via p53/p21 está de acordo com o aumento na proporção de células na fase G1, observado através da análise do ciclo celular (figura 9). A expressão de p21 inibe principalmente CDKs da fase G1/S, diminuindo a quantidade de células encontradas em fase S.

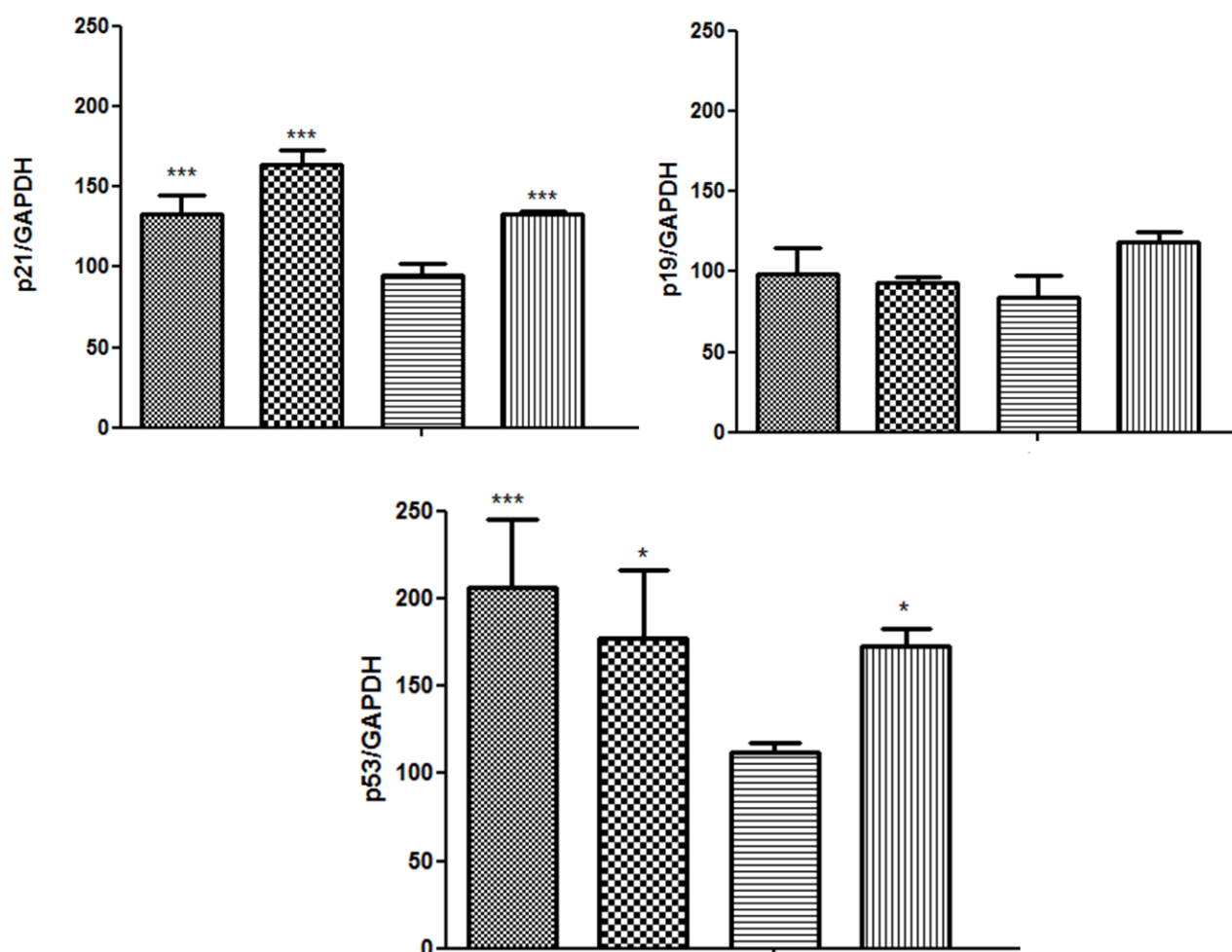


FIGURA 15 – MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE p21, p19 e p53 DA LINHAGEM U87MG FRENTE AO TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS

NOTA: Os resultados representam a média +/- desvio padrão de 5 experimentos independentes e são demonstrados como expressão relativa de p21, p19 e p53 frente à expressão do gene de controle interno GAPDH

6.2 CONFIRMAÇÃO DO POSICIONAMENTO DOS GRUPAMENTOS SULFATO NA FRAÇÃO OX-6Sc

6.2.1 TRIDEUTERIOMETILAÇÃO

Através da análise de metilação conduzida com as frações OX-6Sb e OX-6Sc, Ropelatto (2011) observou a presença de diversos derivados de ramnose

monometilados e não metilados. Dentre eles, foi interessante notar a presença de unidades de 4-Me-Rha mesmo após dessulfatação. A presença desta unidade entre os produtos de metilação da fração dessulfatada pode ser correspondente a pontos de ramificação, ou seja, unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas. Estes pontos de ramificação podem estar não substituídos em C-4 ou sulfatados em C-4. Ainda, podem ser correspondentes a unidade de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2.

Com a finalidade de esclarecer essa dúvida e elucidar a estrutura química fina desses polissacarídeos, foi dada continuidade aos estudos estruturais da fração OX-6Sc. Para tanto, a fração OX-6Sc-R (fração carboxi-reduzida obtida a partir de OX-6Sc) foi submetida a uma nova abordagem da análise de metilação, diferente daquela realizada por Ropelatto (2011). A estratégia desta nova abordagem está descrita abaixo e representada na figura 16:

- 1) metilação com ICH_3 – às hidroxilas livres são ligados grupos CH_3 (Me)
- 2) dessulfatação solvolítica – remoção dos grupos sulfato
- 3) metilação com ICD_3 – às hidroxilas livres, formadas após dessulfatação, são ligados grupos CD_3

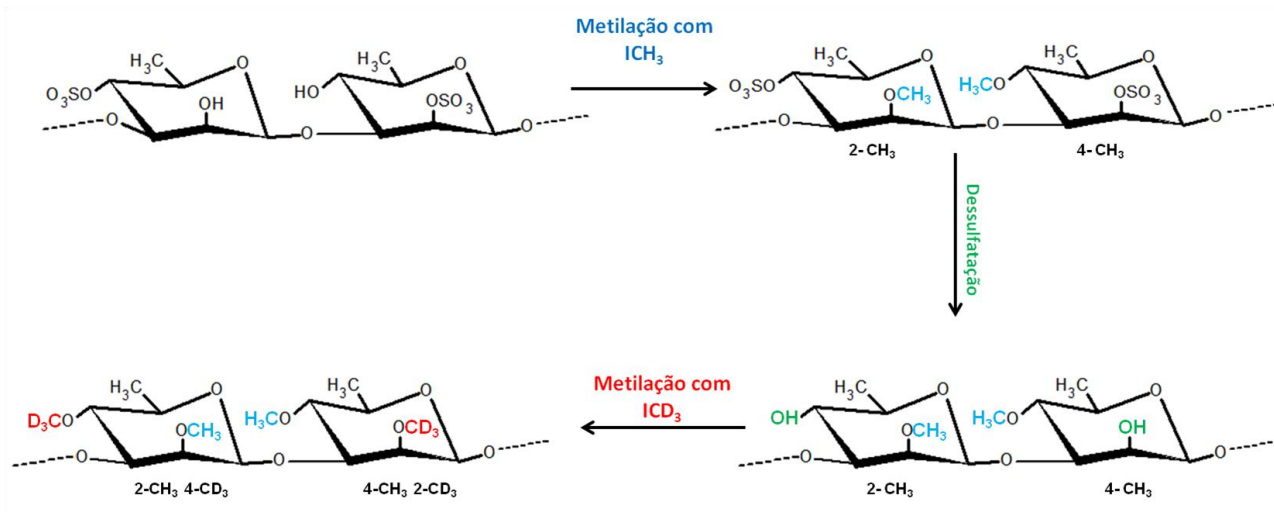


FIGURA 16- SEQUÊNCIA METODOLÓGICA DO PROCESSO DE TRIDEUTERIOMETILAÇÃO DA FRAÇÃO OX-6Sc

Através da análise de CG-EM da fração OX-6Sc-R submetida à análise de metilação sequencial (metilação – dessulfatação – trideuteriometilação) foram confirmados os resultados descritos por Ropelatto (2011), sendo verificada uma diferença apenas na proporção das unidades presentes como pontos de ramificação. A análise do perfil de fragmentação do derivado 4-Ram mostrou, como esperado, fragmentos de massa que indicaram a presença de CH_3 ($m/z = 131$) e CD_3 ($m/z = 134$) em C-4, o que corresponde à presença de pontos de ramificação (ramnose 2,3-dissubstituída) não sulfatados e sulfatados em C-4, respectivamente. Deste modo, a partir das percentagens dos íons 131 e 134, presentes no perfil de fragmentação do derivado 4-Ram, foi possível determinar que 60 % dos pontos de ramificação de ramnose são sulfatados em C-4 (~50 % como foi atribuído por Ropelatto (2011)). Esses dados estão apresentados na tabela 5.

TABELA 5- PROPORÇÃO DE UNIDADES DE RAMNOSE 3- E 2-LIGADAS E 2,3-DISSUBSTITUÍDAS PRESENTES NA FRAÇÃO OX-6Sc

	Rha 3L				Rha 2L			Rha 2,3L	
	3L	3L2S	3L4S	3L2,4S	2L	2L4S	2L3,4S	2,3	2,3-4S
I*	0,5	0,7	1,0	0,2	0,1	0,6	0,6	0,4	0,3
II**	0,5	0,7	1,0	0,2	0,1	0,6	0,6	0,3	0,4

I– Resultados das análises de metilação da fração OX-6Sc-R e OX-6Sc-RD * (Ropelatto, 2011).

II- Análise de metilação sequencial da fração OX-6Sc-R metilada com ICH_3 , dessulfatada e metilada com ICD_3 (Trideuteriometilação).

6.3 ESTRUTURA QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS DE *Gayralia oxysperma*

6.3.1 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE *G. oxysperma*

Os exemplares da macroalga verde *G. oxysperma* foram coletados na baía de Antônia-PR em agosto de 2010 e foram cedidos pela professora Dra. Franciani Pellizzari, da Universidade Estadual do Paraná (UEPR) Câmpus Paranaguá.

As algas secas e moídas foram submetidas a extrações aquosas sequenciais (5 g %) sendo duas realizadas a 25 °C e quatro a 80 °C. Após cada etapa, os extratos foram centrifugados e precipitados com etanol (3:1:1). O precipitado foi ressuspendido, dialisado e liofilizado. Os nomes das frações fazem referência à espécie da alga a partir da qual foram obtidas ($G_o = G.oxysperma$) e ao número de extrações aos quais os resíduos foram submetidos. A estratégia de obtenção está representada na figura 17.

A obtenção de novas frações polissacarídicas foi realizada com o objetivo de verificar a reprodutibilidade do processo de fracionamento dos produtos de degradação controlada de Smith.

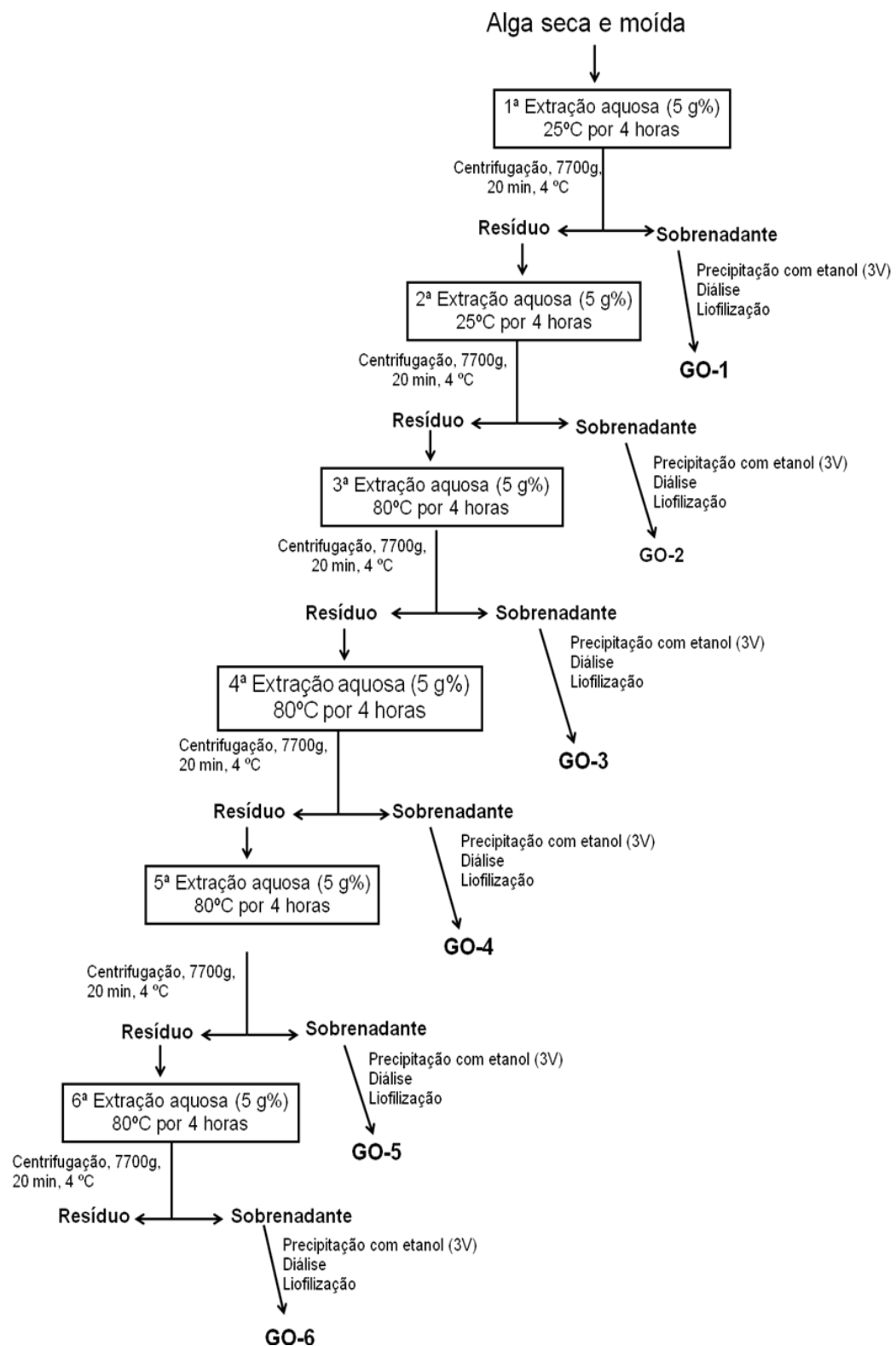


FIGURA 17 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SINTETIZADOS PELA ALGA VERDE *G. oxysperma*

6.3.2 RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *G. oxysperma*

O rendimento obtido no processo de extração aquosa da macroalga variou de 0,78-3,15 %, sendo o rendimento total de aproximadamente 10 % (TABELA 6), menor quando comparado com os valores previamente obtidos para essa espécie, os quais variam de 0,6 a 13,8 % (CASSOLATO *et al.*, 2008). Esse baixo rendimento pode ser explicado pelo maior tamanho da malha utilizada no presente trabalho para moer a macroalga. Outros estudos com macroalgas da ordem Ulvales apresentam rendimento 3,5 a 29,0 %, variando com o método de extração e tempo utilizado (MEDCALF *et al.*, 1975; MAEDA *et al.*, 1991; LAHAYE e ROBIC, 2007). As frações obtidas a 25 °C foram reunidas, gerando a fração Go-1,2.

Os valores de açúcar total das diferentes frações mostraram-se semelhantes entre si, variando entre 60,7-62,5 %. Essas frações apresentam um alto teor de grupamentos sulfato (21,2-30,7 %), além da presença de proteínas (5,2-10,0 %). Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Cassolato *et al.* (2008), os quais foram 23,5-30,9 % e 2,0-8,0 % para grupos sulfatos e proteínas, respectivamente. Todas as frações isoladas apresentaram ácidos urônicos variando entre 5,9-8,0 %

TABELA 6 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE *G. oxysperma*

Amostras ^a	Rend. (%) ^b	Carb. Total (%) ^c	Urônicos (%) ^d	Sulfato (%) ^e	Proteína (%) ^f
Go-1,2	1,1	62,0	8,0	21,2	10,0
Go-3	2,9	62,3	5,9	24,3	8,1
Go-4	3,2	61,1	8,0	24,7	5,2
Go-5	3,1	62,5	7,1	30,7	6,3
Go-6	0,8	60,7	6,8	27,0	7,7
Total	12,1	-	-	-	-

^a frações obtidas por extrações aquosas: a 25 °C (Go-1,2), a 80 °C (Go-3 a Go-6); ^brendimento em relação a alga seca e moída (23,3g); ^cdeterminado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956); ^ddeterminado pelo método de Dodgson e Price (1962); ^edeterminado segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991); ^fdeterminado segundo Lowry *et al.* (1951).

6.3.3 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *G. oxysperma*

A análise da composição monossacarídica das frações Go-1,2 a Go-6 foi determinada após hidrólise ácida, redução, acetilação e análise por GLC-MS dos acetatos de alditóis.

Todas as frações, com exceção daquelas obtidas a 25 °C, apresentaram majoritariamente ramnose em sua composição (41,2-67,5 %) além de arabinose (4,1-8,8 %), xylose (6,1-10,6 %) e glucose (12,3-24,5 %) (tabela 7)

Os valores são condizentes com aqueles obtidos por Cassolato *et al.* (2008) e Ropelatto (2011), a não ser pela presença de 3- e/ou 4-O-metil galactose.

TABELA 7 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES BRUTAS DE *G. oxysperma*

Amostra	Monossacarídeo (mol %) ^a					
	Rha ^b	Ara	Xyl	Me-Gal	Gal	Glc
Go-1,2	22,7	18,2	7,6	24,7	15,5	11,3
Go-3	41,2	8,8	6,6	9,2	10,0	24,3
Go-4	67,5	4,1	10,6	2,5	3,1	12,3
Go-5	61,6	5,4	8,2	4,3	4,3	16,2
Go-6	48,0	7,5	6,1	7,1	6,8	24,5

^a monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^babreviatura dos monossacarídeos: Rha= ramnose; Xyl= xilose; Glc= glucose; Gal= galactose; Ara=arabinose; Man= manose, Me-gal= metil galactose.

6.3.4 ANÁLISES DE RMN DE ¹³C DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *G. oxysperma*

As frações brutas foram analisadas por RMN de ¹³C (figura 18). Todas as frações apresentam espectros complexos com sinais alargados. Os extratos obtidos a 80 °C mostraram-se semelhantes entre si, diferindo-se apenas na intensidade dos sinais.

Pode-se observar a presença de um sinal intenso para todas as frações em aproximadamente 17-18,3 ppm, atribuído ao C-6 da ramnose. O espectro da fração obtida a 25 °C (Go-1,2) difere dos demais pela menor intensidade do pico entre 17-18,3 ppm, o que está de acordo com o menor teor de ramnose observado na análise de composição monossacarídica para esta fração, quando comparada com as frações obtidas a 80 °C (Go3 a Go6).

Todas as frações apresentavam vários sinais na região anomérica. De acordo com o descrito na literatura para heteroramnanas sulfatadas de *G. oxysperma*, os deslocamentos entre 99,0 e 103,1 ppm referem-se as unidades de α-ramnose,

enquanto os sinais em 104,0 a 106 ppm são atribuídos a unidades monossacarídicas na configuração β (CASSOLATO *et al.*, 2008).

Observa-se que a fração Go-1,2 apresenta o sinal em 104,8 ppm em maior intensidade quando comparado com as demais frações, indicando que Go-1,2 possui uma maior quantidade de unidades glicosídicas em configuração β .

Assim, as análises de RMN em conjunto com a composição monossacarídica indicam que a fração de Go-1,2 diferencia-se das frações Go-3 a Go-6 pelo baixo teor de unidades de ramnose e ao alto teor de unidades glicosídicas em configuração β .

Na região do anel observa-se o sinal do C-5 da ramnose em 70,3-70,6 ppm, sendo possível inferir que as unidades de ramnose presentes nas heteroramnanas sulfatadas correspondem a unidades de ramnose na configuração α . Para unidades de β -ramnose os deslocamentos do C-5 encontra-se em 72,3-73,4 ppm (BACKINOWSKY *et al.*, 1980; LIPKIND *et al.*, 1988; JANSSON, KENNE e WIDMALM, 1989).

Os espectros de RMN de ^{13}C , bem como a composição monossacarídica e a análise química estão de acordo com a presença heteroramnanas sulfatadas como descrito anteriormente para esta espécie (CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELATTO, 2011).

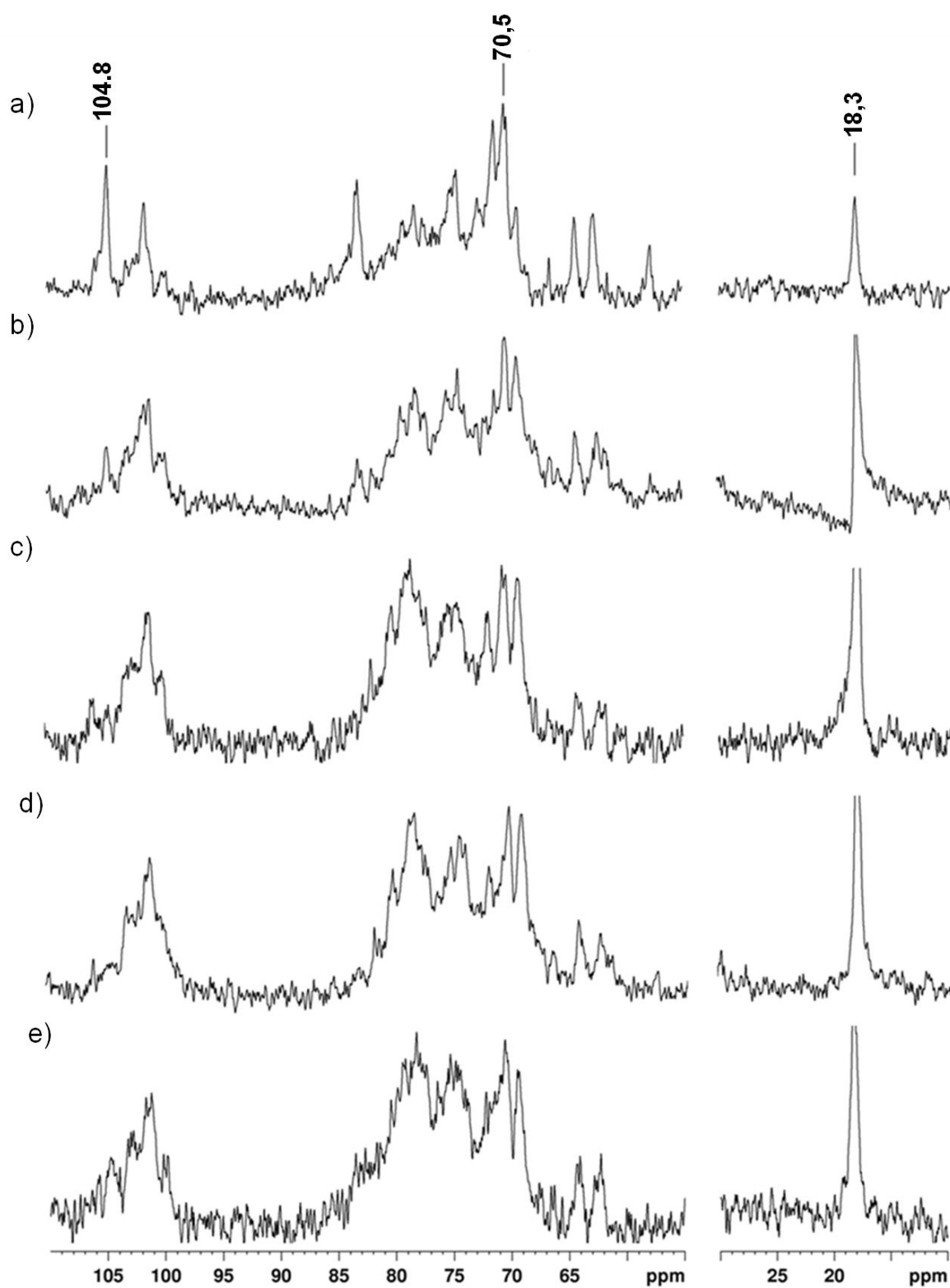


FIGURA 18 – ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *G. oxysperma*: Go-1,2 (a) Go-3 (b) Go-4 (c) Go-5 (d) Go-6 (e)

NOTA: Solvente: D_2O (70 °C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

6.3.5 DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH

Como as frações extraídas a 80 °C apresentaram-se semelhantes entre si em relação à composição química, monossacarídica e à análise do espectro de RMN de ^{13}C , elas foram reunidas originando a fração OX-7, a qual foi submetida a degradação controlada de Smith.

Esse processo tem sido utilizado em nosso laboratório para a obtenção de fragmentos de menor massa molar a partir de heteroramnanas sulfatadas, os quais possuem um grande potencial biológico, além de auxiliar na análise da estrutura química fina destes polímeros (CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELATTO, 2011). Sabe-se que durante o processo de degradação controlada de Smith da heteroramnana homogênea (HPSEC-MALLS-RID) obtida de *G. oxysperma*, as unidades correspondentes aos terminais não redutores de galactose, xilose e ácido glucurônico 2-sulfatado foram oxidadas (CASSOLATO *et al.*, 2008). Já unidades de xilose 3-ligadas, bem como ácido glucurônico 4-ligado 2-sulfatado e a maioria das unidades de ramnose, não foram susceptíveis à degradação parcial. A massa molar do produto de degradação controlada de Smith foi de 109 kDa (dn/dc 0,251), cerca de 14 vezes menor que a massa da fração original, a qual é 1519 kDa (dn/dc 0,118) (CASSOLATO *et al.*, 2008). Na figura 19 está a representação de um exemplo hipotético de carboidrato submetido a degradação controlada de Smith.

O rendimento final da degradação controlada de Smith da fração OX-7 foi de 50 %. O produto do processo foi denominado com o acréscimo da letra “S” ao final de seu nome original (OX-7S), sendo referida também, neste trabalho, como “fração degradada de Smith”.

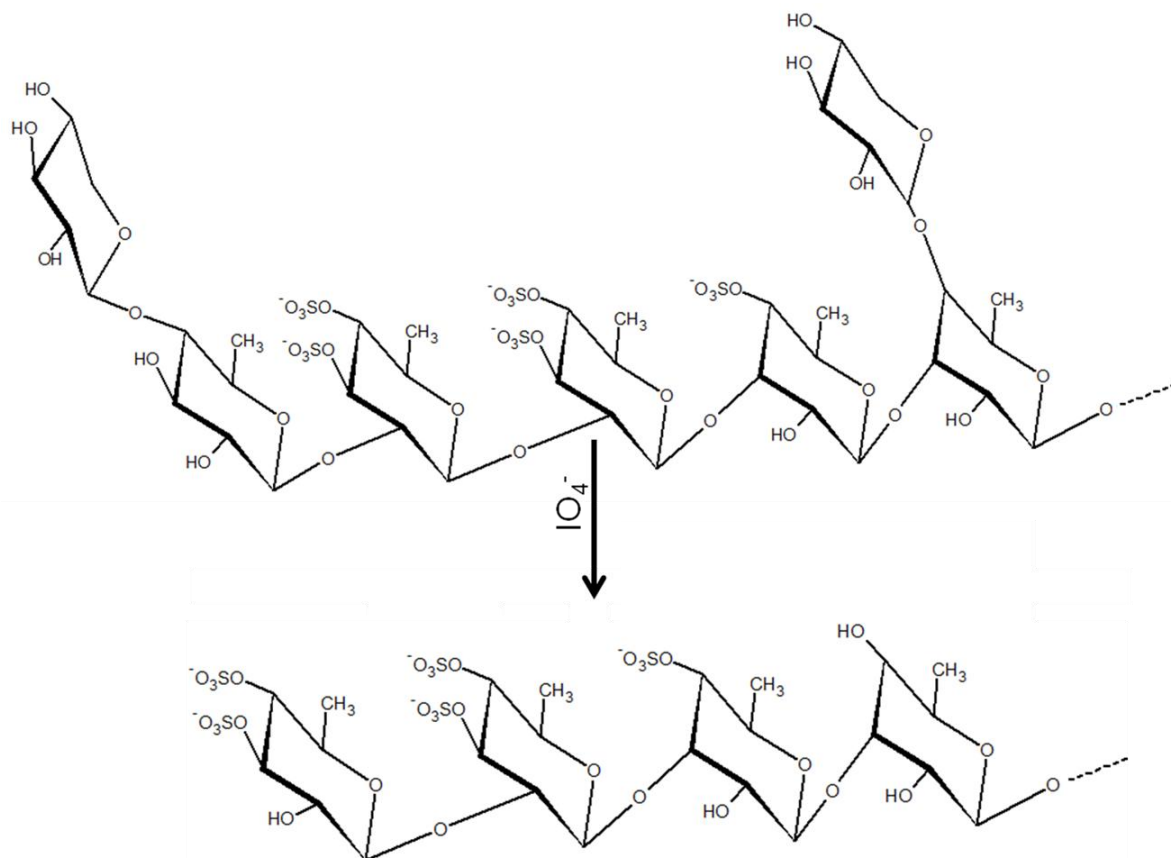


FIGURA 19 – EXEMPLO HIPOTÉTICO DE CARBOIDRATO SUBMETIDO A DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH
 FONTE: O AUTOR, 2013.

6.3.6 Análises químicas e composição monossacarídica da fração degradada de Smith

A amostra submetida à degradação de Smith, OX-7S (34,5 % de sulfato), apresentou em relação a sua amostra original OX-7 (25,9 % de sulfato), uma maior percentagem de grupos sulfatos e uma diminuição nos teores de ácido urônico (7,1 e 3,5 % para OX-7 e OX-7S, respectivamente) (tabela 8).

TABELA 8 – ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO BRUTA (OX-7) E DE SEU PRODUTO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (OX-7S)

Amostras	Rend. (%)	Carb. Total (%)	Urônicos (%)	Sulfato (%)	Proteína (%)
OX-7	-	52,0	7,1	25,9	6,1
OX-7S	49,0	48,6	3,5	34,5	7,8

^aExtratos brutos obtidos a 80 °C reunidos (OX-7), fração obtida a partir de OX-7 através do processo de degradação controlada de Smith (OX-7S); ^bRendimento obtido no processo de degradação controlada de Smith.

Em relação à composição monossacarídica, OX-7S apresentou um aumento na percentagem de ramnose (de 55,4 para 72,6 %) e uma diminuição nos níveis de xilose (de 8,7 para 5,4%), galactose (de 6,0 para 4,2 %) e glucose (de 17,6 para 10,8 %) (tabela 9).

TABELA 9 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO BRUTA (OX-7) E DE SEU PRODUTO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (OX-7S)

Amostras	Monossacarídeo (mol %)					
	Rha	Ara	Xyl	Gal	Glc	3-Me-Gal
OX-7	55,7	7,3	8,7	6,0	17,6	5,0
OX-7S	71,0	2,7	4,8	4,2	10,0	6,4

^aExtratos brutos obtidos a 80 °C reunidos (OX-7), fração obtida a partir de OX-7 através do processo de degradação controlada de Smith (OX-7S); ^bRendimento obtido no processo de degradação controlada de Smith, ^cmonossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^dabreviatura dos monossacarídeos: Rha= ramnose; --Xyl= xilose; Glc= glucose; Gal= galactose; Ara=arabinose; Man= manose.

Os resultados indicam que o polissacarídeo contém uma cadeia principal formada por ramnose cuja maior parte dela não é susceptível a degradação controlada de Smith. A degradação promoveu a oxidação parcial das unidades de glucose e galactose.

Com a finalidade de identificar o posicionamento do grupo CH₃ da galactose naturalmente metilada, a fração OX-7 foi submetida a hidrólise ácida total e acetilação com NaBD₄. A análise por CG-EM dos acetatos de alditóis permitiu identificar os íons 130 e 129 na proporção de 5:1, respectivamente, indicando que a quantidade de 3-metil hexose nessa amostra é cinco vezes maior que a quantidade de 4-metil hexose. Essa metil hexose foi identificada como metil galactose por CG-EM.

O produto de degradação obtido a partir das heteroramnanas sulfatadas de *G. oxysperma* por Cassolato et al. (2008) também apresentou um aumento no teor de ramnose e diminuição nos teores de galactose e glucose. Na ocasião, o processo de degradação controlada de Smith foi conduzido com o polissacarídeo previamente carboxi-reduzido, portanto a diminuição dos teores de galactose e glucose foram correspondentes tanto as hexoses neutras como aos ácidos urônicos presentes no polímero nativo (CASSOLATO *et al.*, 2008).

6.3.7 Análises de RMN do produto de degradação de Smith (OX-7S)

A fração OX-7S foi submetida a análise de RMN de ¹³C, no qual foi obtido um espectro complexo, indicando um alto padrão de substituição da molécula, similar ao encontrado para a fração OX-7 (figura 20 e 21). Tanto OX-7 quanto OX-7S apresentam um sinal intenso entre 18,3 e 18,2 ppm, correspondentes ao C-6 da ramnose. Tal observação é coerente com o alto teor de ramnose encontrado na análise de composição monossacarídica destas amostras. Ainda, o sinal em 70,4 (OX-7) e 70,3 ppm (OX-7S) na região do anel indica que as unidades de ramnose presentes na heteroramnana e nos seus produtos de degradação correspondem a unidades de ramnose na configuração α.

Analisando a região anomérica do espectro de RMN de ^{13}C da fração OX-7, é possível observar um sinal mais intenso em 101,1 ppm. Com a análise do espectro de RMN da fração OX-7S foi possível notar a presença de dois sinais nessa região: em 101,0 e em 101,3 ppm. Esses sinais são referentes ao C-1 das unidades de ramnose 2-ligada 4-sulfatada e 2-ligada 3,4-sulfatada, respectivamente.

Já o sinal em 102,0 ppm, referente as unidades de ramnose 2-ligada não sulfatadas, encontra-se em menor intensidade na fração OX-7S quando comparada com a fração OX-7, indicando que essas unidades no polímero original foram susceptíveis a oxidação.

É possível notar também, sinais que indicam a presença de unidades de ramnose 3-ligada. Para a fração OX-7, o sinal em 103,1 ppm foi atribuído ao C-1 das unidades de ramnose 3-ligada sulfatada ou não em C-4 e em 100,1 ppm, referente ao C-1 das unidades de ramnose 3-ligada 2-sulfatada. Para a fração OX-7S esses sinais foram identificados em 103,0 e 100,0 ppm, respectivamente.

O sinal em aproximadamente 81,7 ppm corresponde ao C-4 de unidades de ramnose 2-ligada-4-sulfatada. Outro sinal característico de C-4 é o 80,3 ppm, que foi atribuído as unidades de ramnose 3-ligada-4-sulfatada (CASSOLATO *et al.*, 2008) (figura 22). Em relação as unidades monossacarídicas na configuração β (glucose, xilose, galactose), o espectro de RMN de ^{13}C da fração OX-7 apresenta sinais em aproximadamente 66,4 ppm correspondentes ao C-5 de unidades de xilose 4-ligada ou como terminais não redutores e em 62,6 ppm atribuídos ao C-6 livre de hexoses. Esses sinais praticamente desaparecem após a degradação de Smith, indicando que essas unidades foram oxidadas.

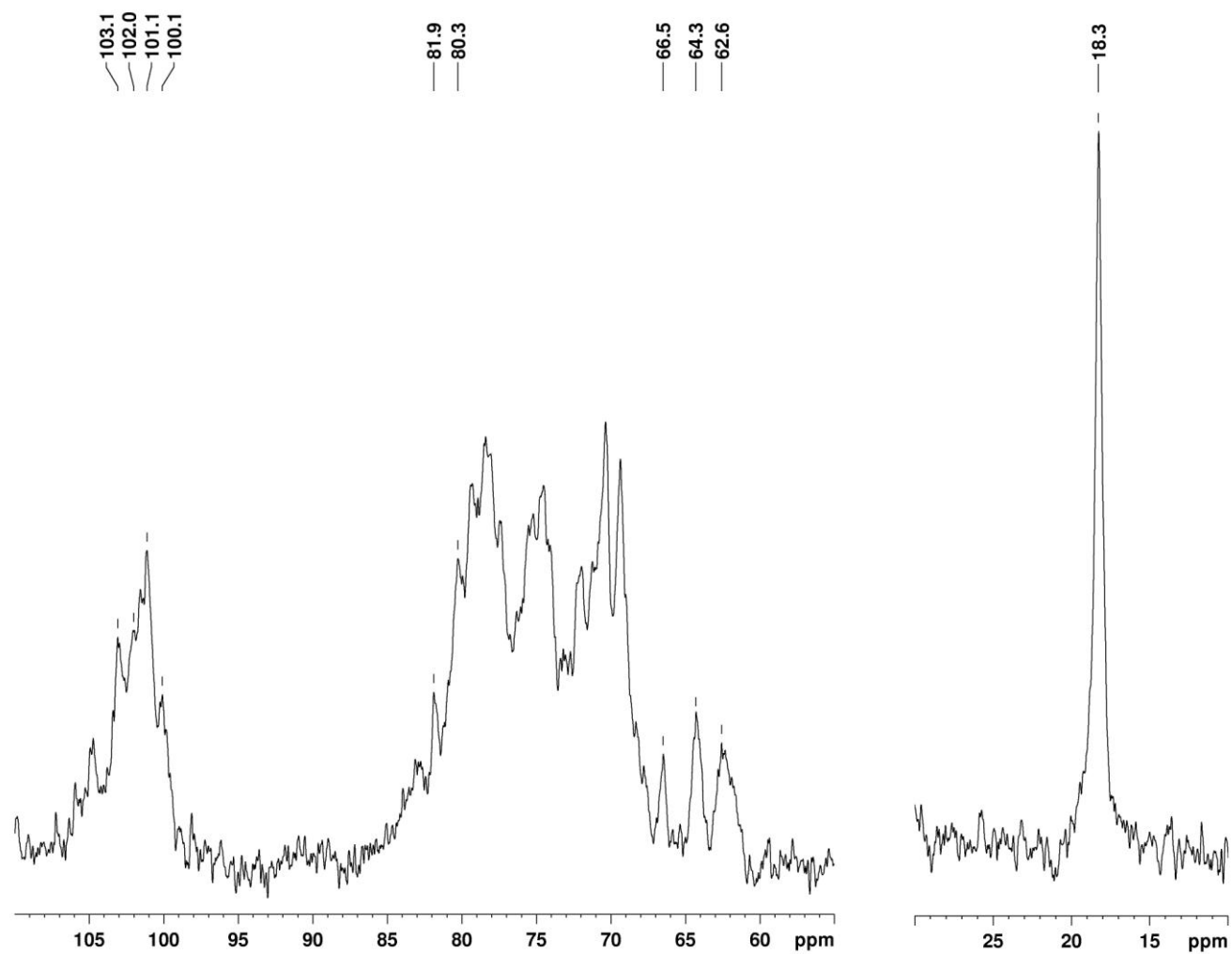


FIGURA 20 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7

NOTA: Solvente: D_2O (70 °C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

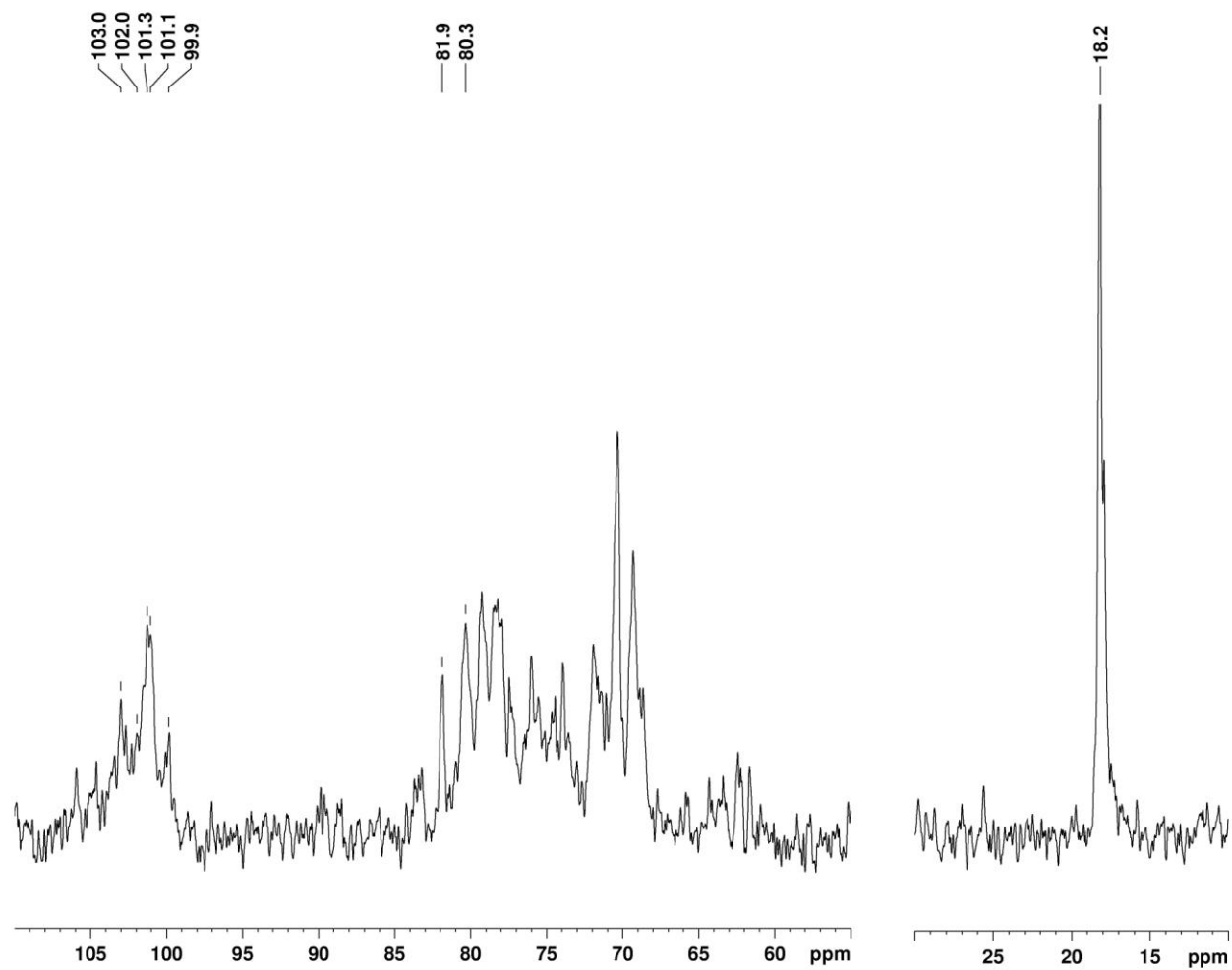


FIGURA 21 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7S

NOTA: Solvente: D_2O (70 °C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

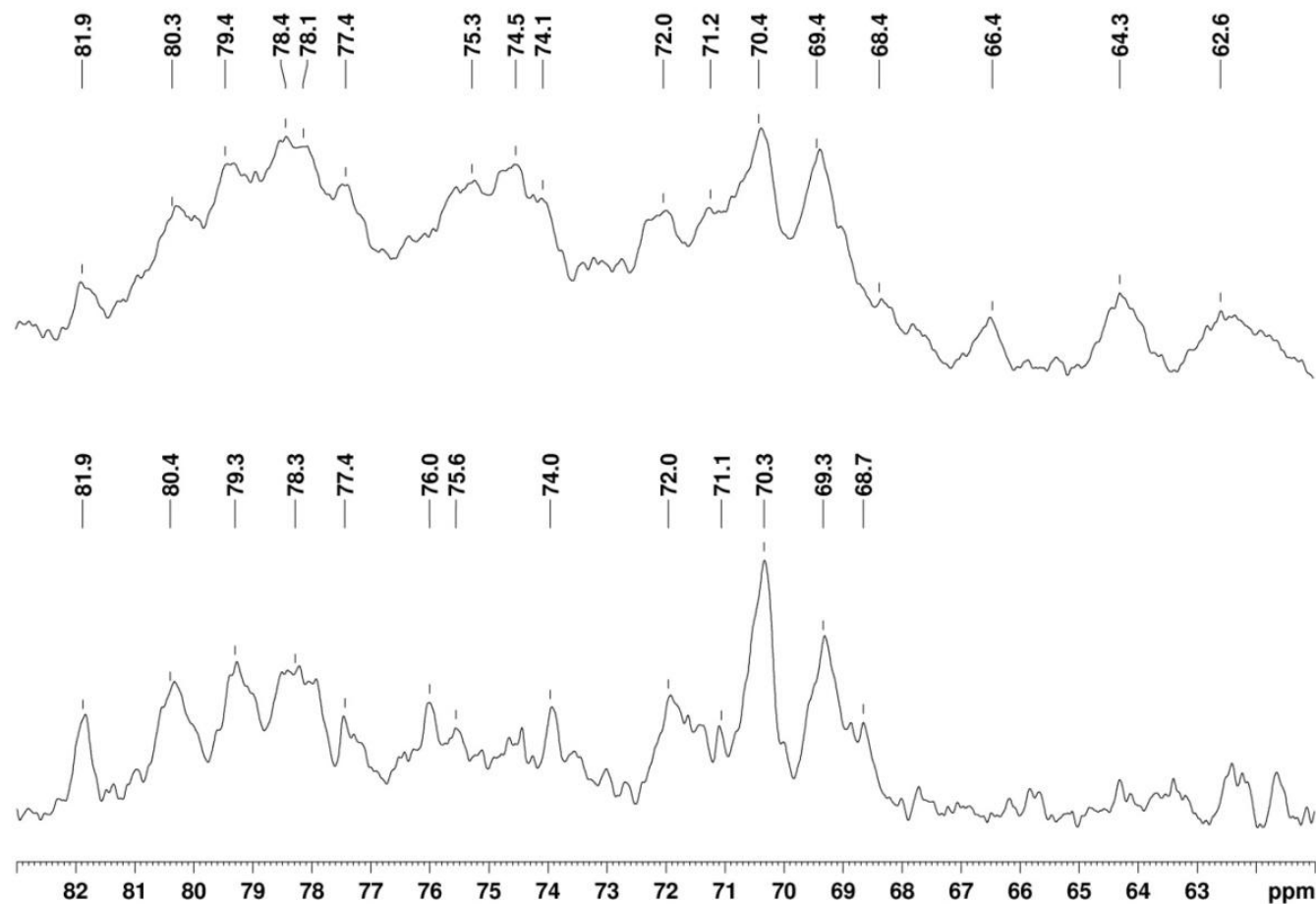


FIGURA 22 – ESPECTROS DA REGIÃO DO ANEL DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7 (a) E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH DE SMITH (b) OX-7S

NOTA: Solvente: D_2O (70 °C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

6.3.8 Análise da homogeneidade da fração OX-7S

A fração OX-7S foi submetida a uma análise de cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração (HPSEC-MALLS-IR), a fim de verificar a sua homogeneidade. A fração OX-7S apresentou no índice de refração um perfil heterogêneo, indicando a presença de polissacarídeos de diferentes massas molares. É possível observar que a amostra não foi sensível a detecção por espalhamento de luz, indicando que se trata de uma fração contendo polissacarídeos de baixa massa molar (figura 23).

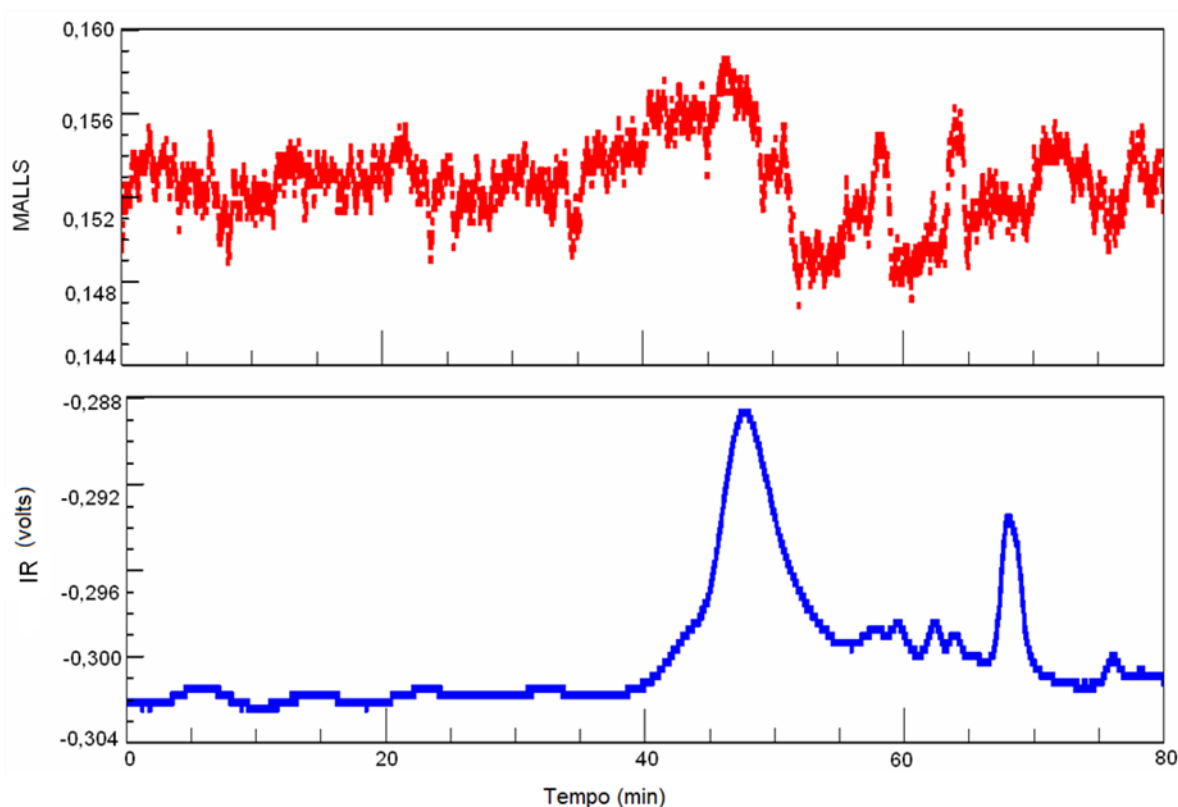


FIGURA 23 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM ESPALHAMENTO DE LUZ NO ÂNGULO DE 90° E DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DA FRAÇÃO OX-7S

Ainda, é possível observar, a partir da análise por HPSEC com detector de IR que a fração OX-7S eluiu em um tempo maior em relação a fração original OX-7, indicando que o processo de degradação controlada de Smith originou um produto de menor massa molar (figura 24).

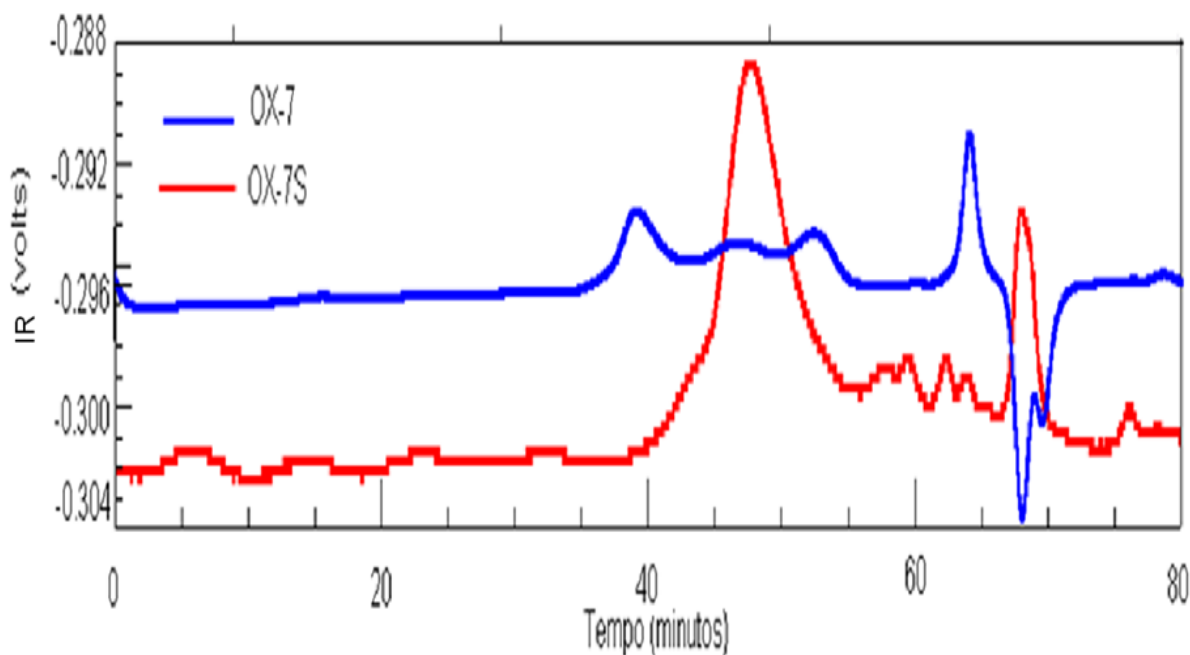


FIGURA 24 – COMPARAÇÃO DO PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES OX-7 E OX-7S

6.3.9 FRACIONAMENTO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (OX-7S)

Como a análise do perfil cromatográfico por HPSEC-MALLS-IR da fração OX-7S indicou a presença de polissacarídeos com diferentes massas molares, essa fração foi submetida ao fracionamento por cromatografia de troca aniônica (DEAE-Sephacel).

A fração OX-7S (630mg) foi eluída com água destilada e sequencialmente com gradiente de NaCl: 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,50, 1,75 e 2,0 M, obtendo-se, respectivamente, as frações OX-7Sw, OX-7Sa, OX-7Sb, OX-7Sc, OX-7Sd, OX-7Se, OX-7Sf e OX-7Sg.

6.3.10 Rendimento e análises químicas das frações obtidas a partir de OX-7S após a cromatografia de troca iônica

O rendimento total obtido para a fração cromatografada foi de 84,0 % em relação a massa inicial aplicada na coluna. As frações de maior rendimento foram OX-7Sd e OX-7Se, eluídas com 1,25 e 1,50 M de NaCl respectivamente.

A fração de maior rendimento (OX-7Sd) apresentou maior quantidade de açúcar total e de grupamentos sulfato (53,4 e 42,8 % respectivamente), bem como uma baixa quantidade de urônico (1,4 %) (tabela 10).

TABELA 10 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS SUBFRAÇÕES DE OX-7S OBTIDAS APÓS CROMATOGRAPHIA DE TROCA IÔNICA

Amostras	Rend (%)^a	Açúcar Total (%)^b	Urônicos (%)^c	Sulfato (%)^d	Proteína (%)^e
OX-7Sw	11,2	n.d.	0,3	9,6	n.d.
OX-7Sa	2,9	30,6	n.d	10	17,2
OX-7Sb	4,5	38,8	0,8	24,7	8,5
OX-7Sc	15,7	37,3	3,5	21,5	4,3
OX-7Sd	27,9	53,4	1,4	42,8	4,5
OX-7Se	17,9	35,8	2,7	31,7	1,7
OX-7Sf	0,8	n.d.	n.d	21,4	n.d.
OX-7Sg	2,9	14,8	1,0	n.d.	10,3

n.d.= não determinado; ^arendimento em relação à fração submetida à cromatografia de troca iônica (630mg);

As frações foram submetidas ao processo de hidrólise total (item 4.6) para análise de suas composições monossacarídicas, cujos resultados são apresentados na tabela 11.

A fração OX-7Sw, eluída com água, é constituída majoritariamente por glucose. Também, foi observado um alto teor de glucose para a fração eluída com

2,0 M de NaCl (OX-7Sg). Já a fração com maior teor de ramnose foi a fração de maior rendimento OX-7Sd (95,1 %), também tendo sido encontrado em menores quantidades xilose e glucose.

No trabalho realizado por Ropelatto (2011), os produtos de degradação controlada de Smith eluídos com 1,0 e 1,5 M de NaCl também mostraram-se constituídos majoritariamente por ramnose (93,3 a 95,0 %), com menores quantidades de xilose (2,0 a 3,8 %) e glucose (2,9 a 3,0 %).

TABELA 11 –COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA FRAÇÃO OX-7S

Amostras	Monossacarídeo(mol %) ^a					
	Rha ^b	Ara	Xyl	Gal	Glc	3/4 Me-Gal
OX-7Sw	25,6	-	-	29,4	54,0	-
OX-7Sb	50,6	tr.	tr.	1,2	22,1	24,4
OX-7Sc	84,5	tr.	1,4	tr.	8,1	5,3
OX-7Sd	95,1	tr.	1,5	tr.	2,6	-
OX-7Se	91,7	2,5	5,8	-	-	-
OX-7Sg	34,5	1,2	-	tr.	55,1	-

tr = traços. Foram considerados traços % menores que 1%; ----- = não identificado; ^amonossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^babreviatura dos monossacarídeos: Rha= ramnose; Xyl= xilose; Glc= glucose; Gal= galactose; Ara=arabinose; Man= manose.

6.3.11 Análise da homogeneidade

As frações de maior rendimento obtidas, OX-7Sd e OX-7Se foram analisadas por HPSEC-MALLS com o objetivo de verificar se o fracionamento em DEAE-Sephacel foi capaz de gerar uma fração purificada. Como é possível verificar nas figuras 25a e 25b ambas as frações apresentaram perfil menos heterogêneo.

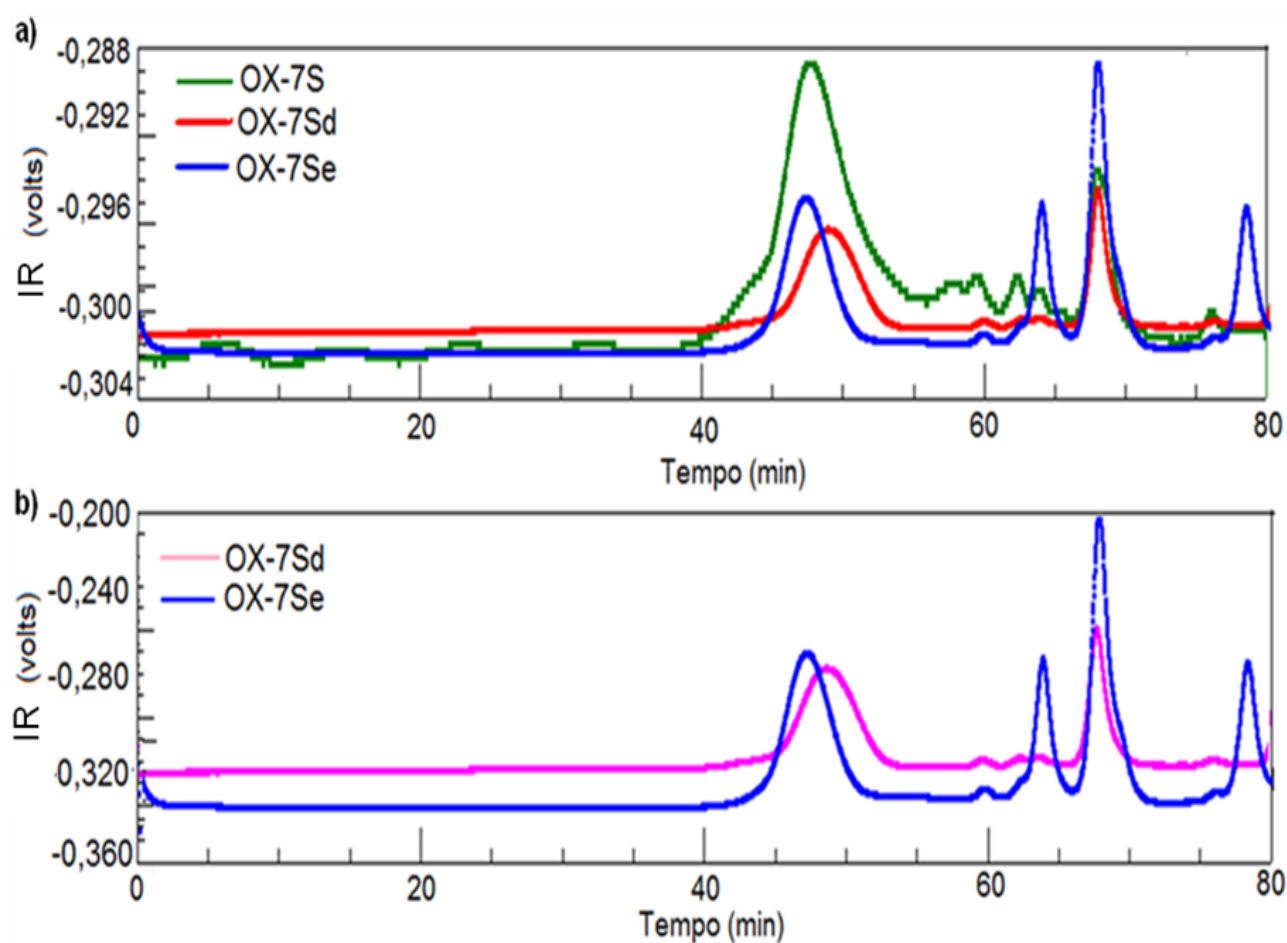


FIGURA 25 – COMPARAÇÃO DO PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES a) OX-7S, OX-7Sd e OX-7Se e b) OX-7Sd e OX-7Se

6.3.1.2 Análises de RMN de ^{13}C da fração OX-7Sc, OX-7Sd e OX-7Se

A análise de RMN de ^{13}C mostrou que as frações OX-7Sc, OX-7Sd e OX-7Se apresentam um perfil semelhante à fração original OX-7S (figura 26), diferindo apenas na intensidade dos sinais. O sinal em 18,2 ppm para as frações OX-7Sc e OX-7Sd e em 18,1 ppm para OX-7Se, correspondem ao C-6 da ramnose.

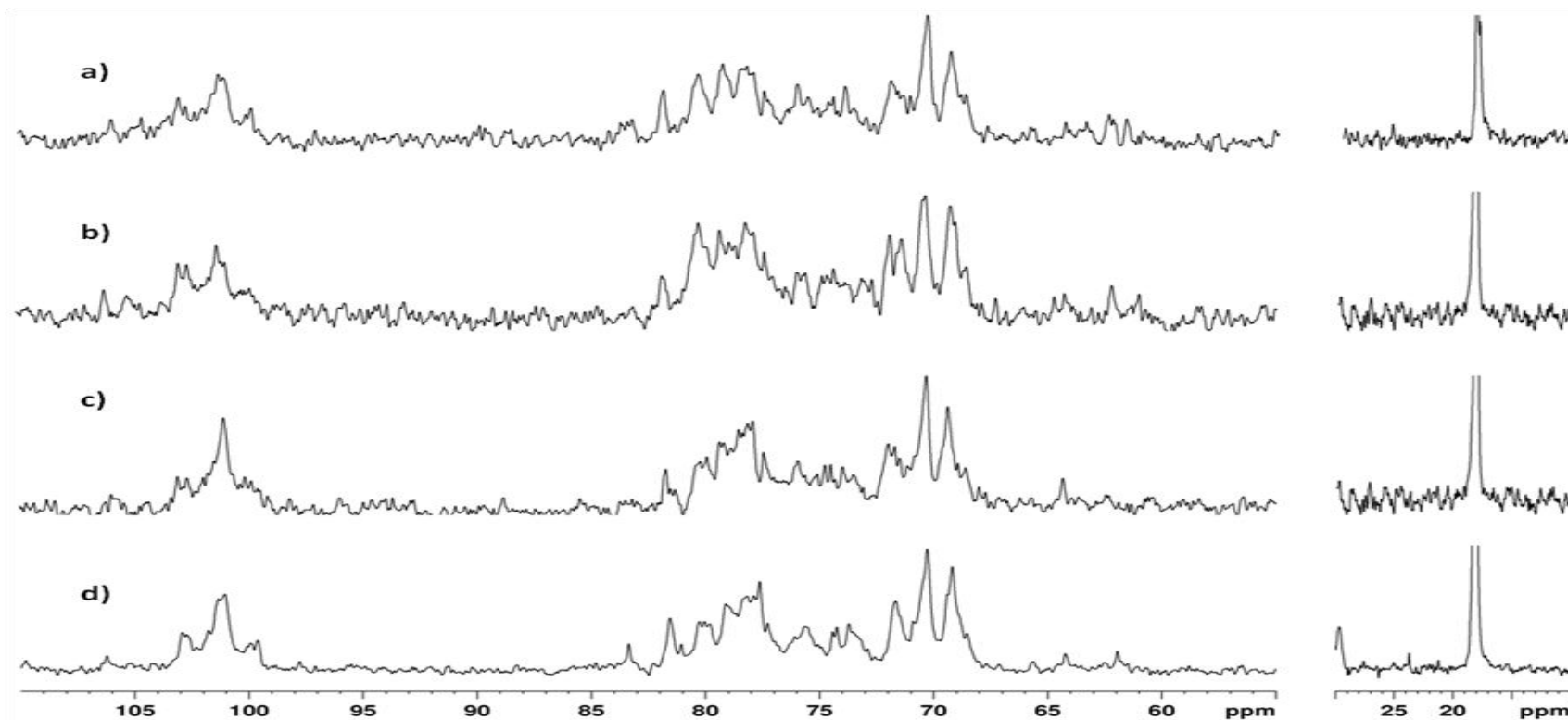


FIGURA 26 – ESPECTROS DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7S (a) E DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS O FRACIONAMENTO EM DEAE-SEPHACEL OX-7Sc (b), OX-7Sd (c) e OX-7Se (d)

NOTA: Solvente: D_2O (70 °C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

O sinal de maior intensidade em 101,3 ppm presente em OX-7Sc e 101,1 ppm em OX-7Sd e OX-7Se foram atribuídos ao C-1 das unidades de ramnose 2-ligadas sulfatadas em C-4 e/ou C-3 e C-4. Os sinais em 102,9 ppm (OX-7Sc e OX-7Se) e 103,1 ppm (OX-7Sd) foram atribuídos ao C-1 das unidades de ramnose 3-ligada e 3-ligada 4-sulfatada. Já o C-1 das unidades de ramnose 3-ligada 2-sulfatada foi assinalado em 100,1 ppm (OX-7Sc), 100,2 ppm (OX-7Sd) e em 100,0 ppm (OX-7Se). O deslocamento que a sulfatação em C-2 exerce sobre o C-1 está de acordo com o que foi descrito para essa espécie de macroalga (CASSOLATO *et al.*, 2008).

Na região do anel dos espectros de RMN de ^{13}C há a presença de um sinal de alta intensidade em aproximadamente 70,3-70,4 ppm, correspondente ao C-5 de α -ramnose. O C-4 sulfatado das unidades de ramnose 2-ligada foi assinalado em 81,8, 81,7 e 81,6 ppm para OX-7Sc, OX-7Sd e OX-7Se respectivamente, sendo o C-5 identificado em 69,2 ppm (OX-7Sc e OX-7Se) e 69,4 ppm (OX-7Sd) e em 69,2 ppm (OX-7Se). Para as unidades de ramnose 3-ligada, o C-4 sulfatado foi assinalado em 80,3 ppm (OX-7Sc e OX-7Se) e 80,2 ppm (OX-7Sd), enquanto que o C-5 dessas unidades foi identificado em 68,6 ppm (OX-7Sc e OX-7Sd) e em 68,9 ppm (OX-7Se).

Para a fração OX-6Sc foram identificados sinais na região 61,9-62,4 ppm, correspondentes ao C-6 livre das unidades de hexose presentes nessa amostra. A maior intensidade dessa sinal para a fração OX-7Sc em relação as frações OX-7Sd e OX-7Se está de acordo com o observado na composição monossacarídica, a qual mostrou que a fração OX-7Sc possui 8,1 % de glucose além de 4,5 % de metil galactose, enquanto que OX-7Sd possui 2,6 % de glucose. Para a fração OX-7Se não foi detectado hexose.

Assim, a análise de RMN de ^{13}C sugere que essas heteroramnanas sulfatadas são constituídas por unidades de ramnose 2- e 3-ligada, com sulfatação em diferentes posições, assim como observado anteriormente em trabalhos com os polissacarídeos de *G. oxysperma* (CASSOLATO *et al.*, 2008, ROPELATTO, 2011) A análise de RMN e composição monossacarídica sugere que a fração OX-6Sc possui uma maior quantidade de unidades de hexoses com configuração β .

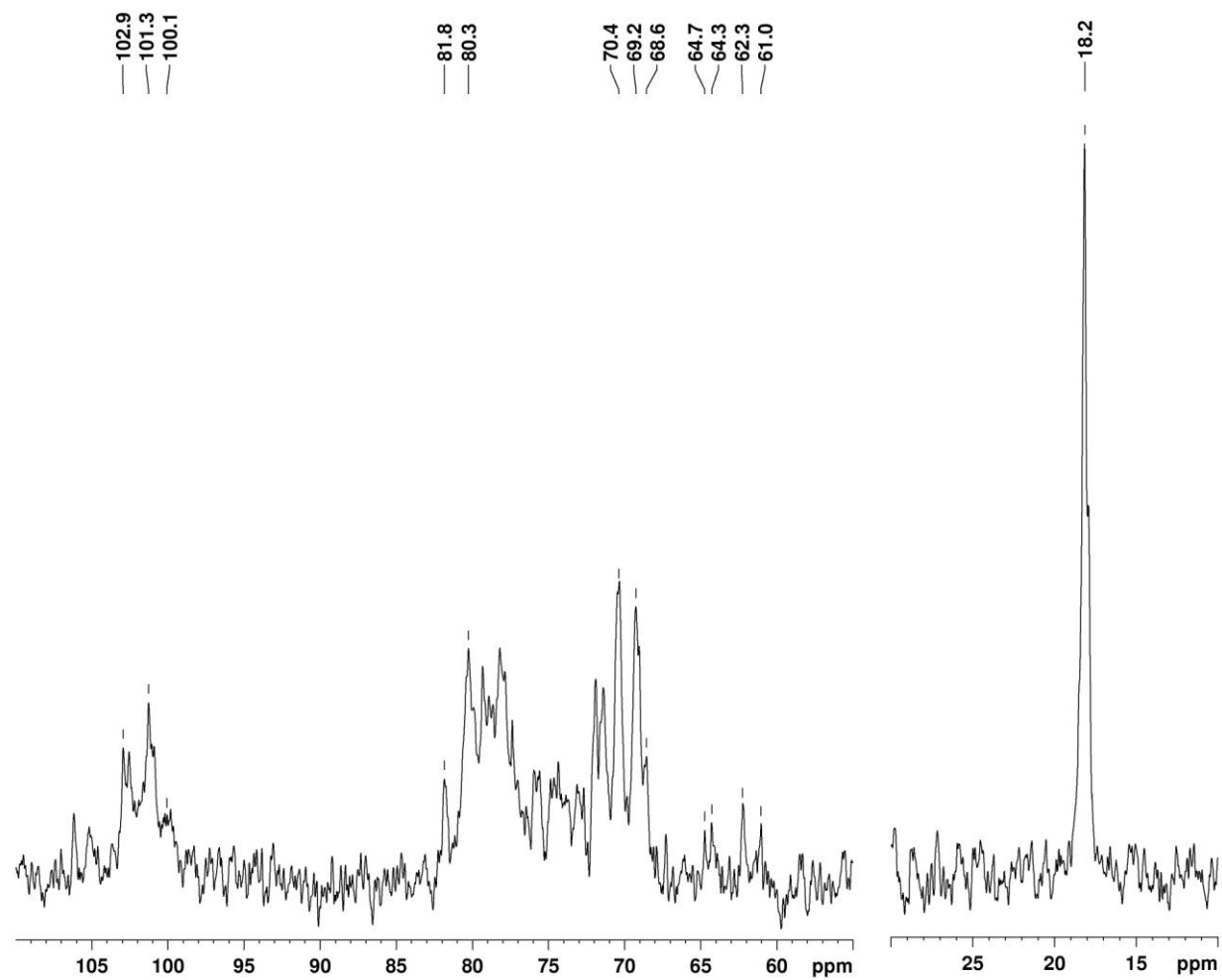


FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7Sc

NOTA: Solvente: D_2O (70 °C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

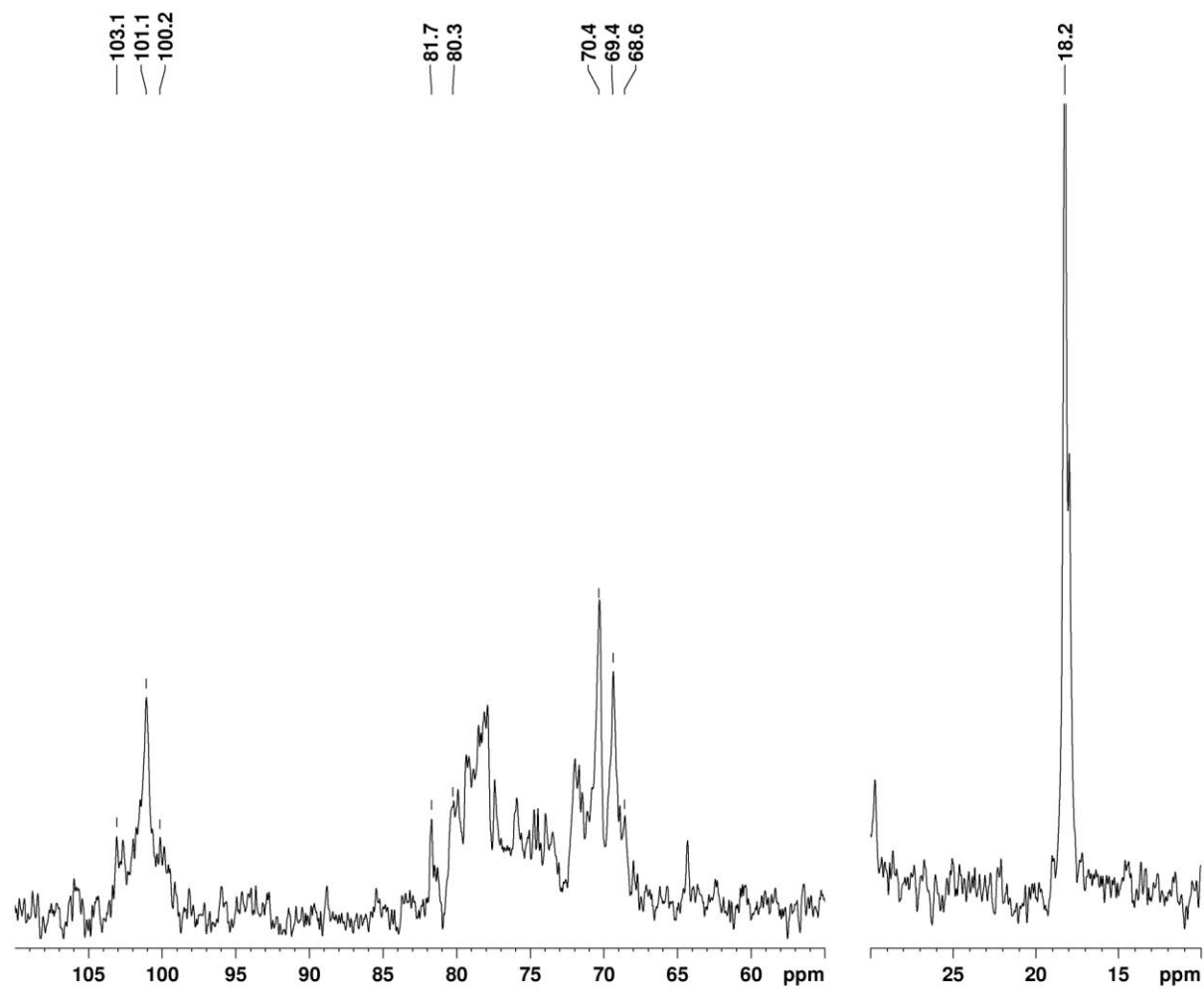


FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7Sd

NOTA: Solvente: D_2O (70 °C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

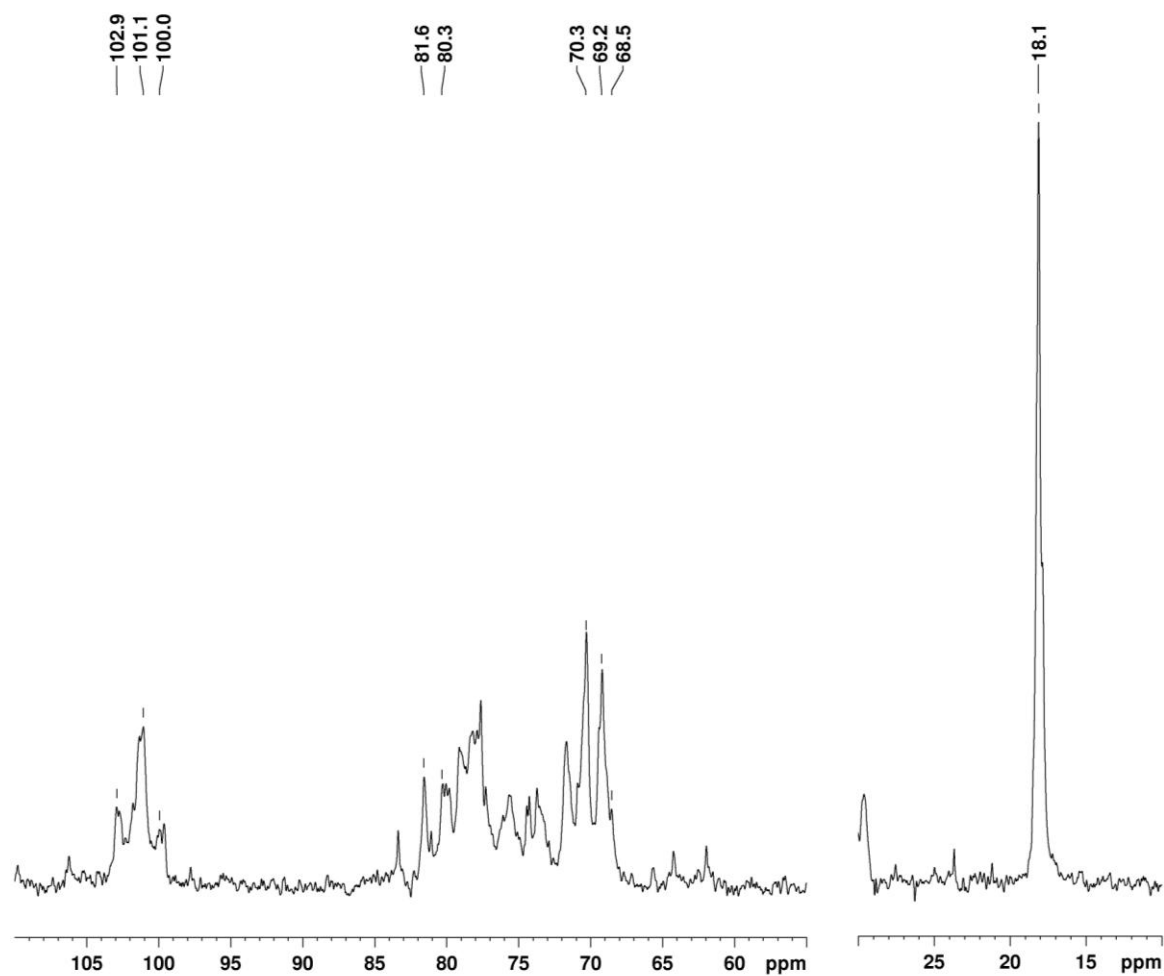


FIGURA 29 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7Se

NOTA: Solvente: D_2O (70 °C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

6.3.13 DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DA FRAÇÃO OX-7Sd

Com a finalidade de determinar o posicionamento dos grupos sulfato na fração OX-7Sd, foi conduzida a dessulfatação solvolítica dessa amostra. O espectro de RMN da fração dessulfatada (OX-7SdD) está representado na figura 30.

6.3.14 ANÁLISES DE RMN BIDIMENSIONAIS DA FRAÇÃO OX-7Sd E OX-7SdD

As análises de RMN bidimensionais (HSQC e COSY) conduzidas com o produto de degradação de Smith (OX-7Sd) e dessulfatado (OX-7SdD) permitiram correlacionar seus átomos de C e H. Os assinalamentos foram comparados com aqueles obtidos para os polissacarídeos produzidos por essa macroalga (CASSOLATO *et al.*, 2008) (figura 31).

O espectro de RMN de ^{13}C da fração dessulfatada (OX-7SdD) mostrou-se mais simplificado quando comparado com a correspondente fração sulfatada OX-7Sd, apresentando dois sinais principais na região anomérica: em 102,0 e 103,1 ppm, atribuídos as unidades de ramnose 2- e 3-ligadas, respectivamente (SENCHENKOVA *et al.*, 1999; OVOD *et al.*, 2004; CASSOLATO *et al.*, 2008).

O sinal em 103,1 ppm presente no espectro de ^{13}C da fração OX-7SdD apresentou acoplamento no espectro de HSQC com os seus respectivos prótons em 5,07 e em 4,97 ppm, indicando que essas unidades encontram-se em ambientes químicos diferentes. Conforme descrito na literatura, o acoplamento do sinal em 103,1 ppm com o 5,07 ppm é atribuído ao C-1/H-1 das unidades de ramnose 3-ligadas, ligadas ao C-3 de outra unidade de ramnose, enquanto o acoplamento 103,1/4,97 corresponde as unidades de ramnose 3-ligadas, ligadas ao C-2 de outra unidade de ramnose (OVOD *et al.*, 2004; CASSOLATO *et al.*, 2008).

O sinal em 102,0 ppm, referente as unidades de ramnose 2-ligadas apresentou acoplamento em 5,19 ppm no espectro de HSQC. Não foi observado o acoplamento do sinal em 102,0 com o próton em 5,27 ppm, característico de unidades de ramnose 2,3- dissubstituídas, indicando um baixo grau de ramificação dessa molécula. O mesmo foi observado por Cassolatto *et al.* (2008) através análise de RMN mono e bidimensionais do produto de degradação de Smith, indicando que os pontos de ramificação no polímero original foram significativamente removidos após a degradação controlada de Smith.

Os espectros de HSQC das frações OX-7Sd e OX-7SdD apresentaram acoplamentos em 105,6/4,58 e 105,9/4,55 ppm, respectivamente referentes ao C-1/H-1 das unidades glicosídicas em configuração β , tais como β -D-xilose e/ou ácidos urônicos (GORIN e MAZUREK, 1975; CASSOLATO *et al.*, 2008). Foi observado, através da análise de COSY, que o sinal em 4,55 ppm (H-1 das unidades de xilose) correlaciona com sinais em 3,33 e com 3,37 ppm referentes ao H-2 desta pentose em diferentes ambientes químicos (C-2 das unidades de xilose em 74,4 ppm). O assinalamento de C-2 dessas unidades de acordo com os resultados de RMN de ^{13}C do metil glicosídeo de xilose (GORIN e MAZUREK, 1975). As correlações em 79,7/4,16 e 73,7/3,96 ppm, foram atribuídas aos C-4/H-4 e C-3/H-3, respectivamente das unidade de β -D-xilose 4-ligada. Estes assinalamentos estão de acordo com o efeito α e β , respectivamente ocasionados pela substituição em C-4 (GORIN e MAZUREK 1975) e com Ishii *et al.* (2008), que ao estudarem oligossacarídeos de 2-aminobenzamida, assinalaram o C-4 e C-3 das unidades de β -D-xilose 4-ligada em 78,0-78,1 e 75,3 e ppm, respectivamente. No espectro de HSQC da fração OX-7SdD os acoplamentos em 66,4/3,93 e 3,30 ppm foram atribuídos ao C-5 e seus respectivos prótons geminais (H-5a e H-5b) das unidades de β -D-xilose.

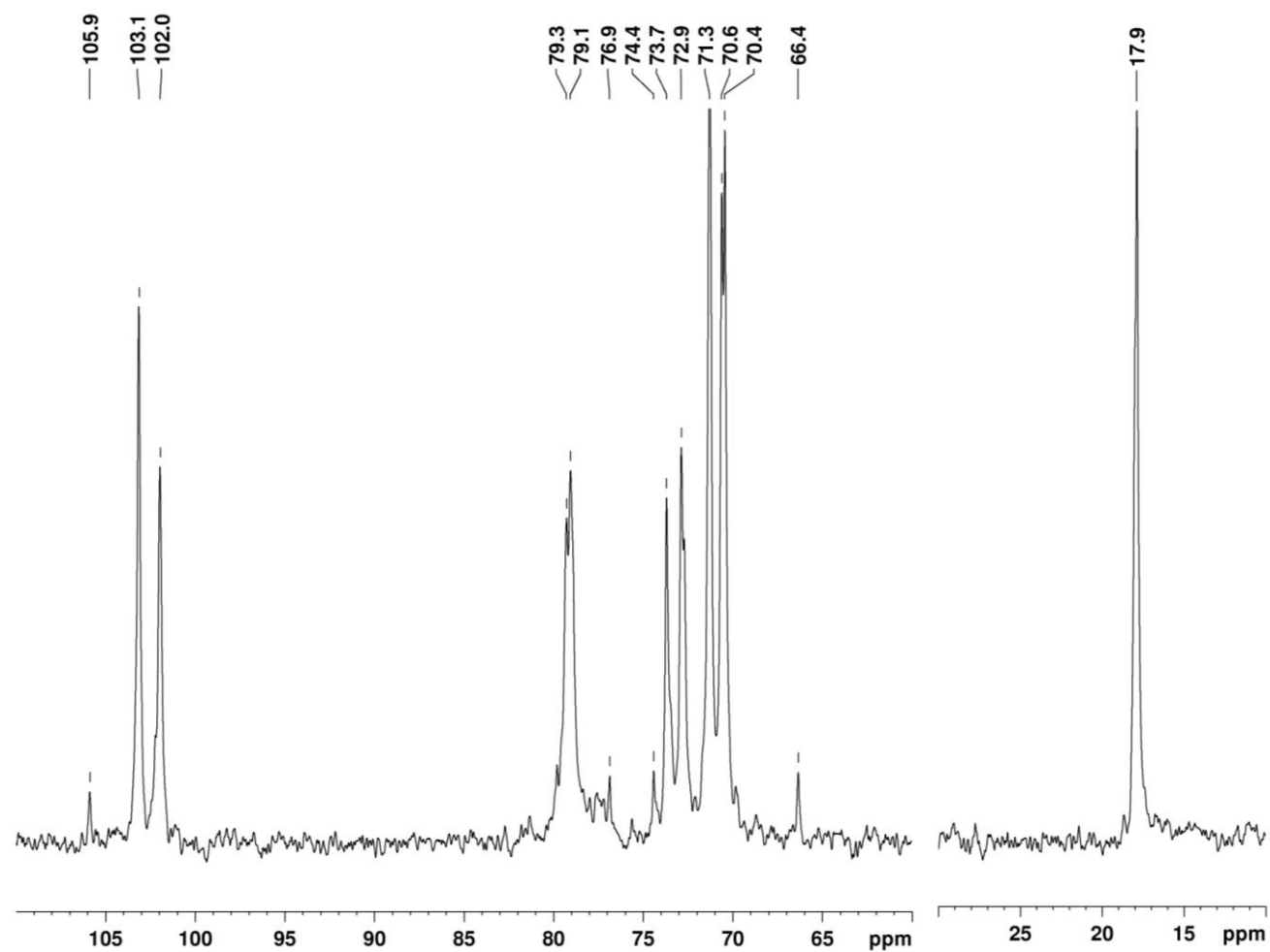


FIGURA 30 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OX-7SdD

NOTA: Solvente: D_2O (70 °C, pH 7); acetona como padrão interno 31,45 ppm.

Através da análise dos espectros mono- e bidimensionais da fração OX-7Sd foi possível identificar os sinais dos carbonos sulfatados das unidades de ramnose 2-ligada e 3-ligada.

Na região anomérica do espectro de HSQC da fração OX-7Sd o acoplamento dos sinais em 101,1/5,27 ppm correspondem ao C-1/H-1 das unidades de ramnose 2-ligadas 4-sulfatadas. Estes sinais também poderiam corresponder ao C-1/H-1 das unidades de ramnose 2,3 dissubstituídas, sulfatadas em C-4 ou não sulfatadas em C-4 (KNIREL *et al.*, 1998a; CASSOLATO *et al.*, 2008). As correlações 81,7/4,29 ppm foram atribuídos aos C-4/H-4 de unidades de ramnose 2-ligada sulfatada em C-4 (C-5/H-5 em 68,6/3,94 ppm) (CASSOLATO *et al.*, 2008).

O C-1/H-1 das unidades de ramnose 3-ligadas e 3-ligadas 4-sulfatadas foi assinalado em 103,1/5,07. Também foi possível identificar os sinais de C-2 (71,4) e H-2 (4,15), consistente com a presença do C-2 livre. As correlações C-4/H-4 e o C-5/H-5 das unidades de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas foram assinalados em 80,3/4,37 e 69,4/3,94 ppm, respectivamente (CASSOLATO *et al.*, 2008).

Os acoplamentos em 100,2/1/5,47 e em 100,5/5,35 no espectro de HSQC foram atribuídos as unidades ramnose 3-ligadas 2-sulfatadas e 3-ligadas 2,4-sulfatadas. Os sinais de H-1 5,35 e 5,49 ppm correlacionam no espectro de COSY com o H-2 em 4,71 ppm. Esse sinal de H-2 acopla no espectro de HSQC com o C-2 em 78,4 ppm (CASSOLATO *et al.*, 2008).

O espectro de COSY apresenta a correlação do H-2 (4,15) das unidades de ramnose 3-ligadas 2-sulfatadas com o H-3 em 4,07, o qual acopla no espectro de HSQC com o C-3 em 76,0 ppm. Comparando o espectro da fração nativa OX-7Sd com o da fração dessulfatada OX-7SdD, pode-se observar o desaparecimento do sinal em 76,0 ppm. O sinal do C-3 de ramnose 3-ligada não sulfatada foi assinalado em 79,3 ppm, portanto, o deslocamento deste sinal está de acordo com o efeito β que a sulfatação em C-2 exerce sobre o C-3. (GORIN e MAZUREK, 1975; LAHAYE *et al.*, 1999).

Ainda, corroborando com esse assinalamento, foi possível observar que o sinal correspondente ao H-3 em 4,07 ppm correlaciona com o sinal em 3,60 ppm, referente ao H-4 das unidades de ramnose 3-ligada (acoplado com o 73,1 ppm no HSQC).

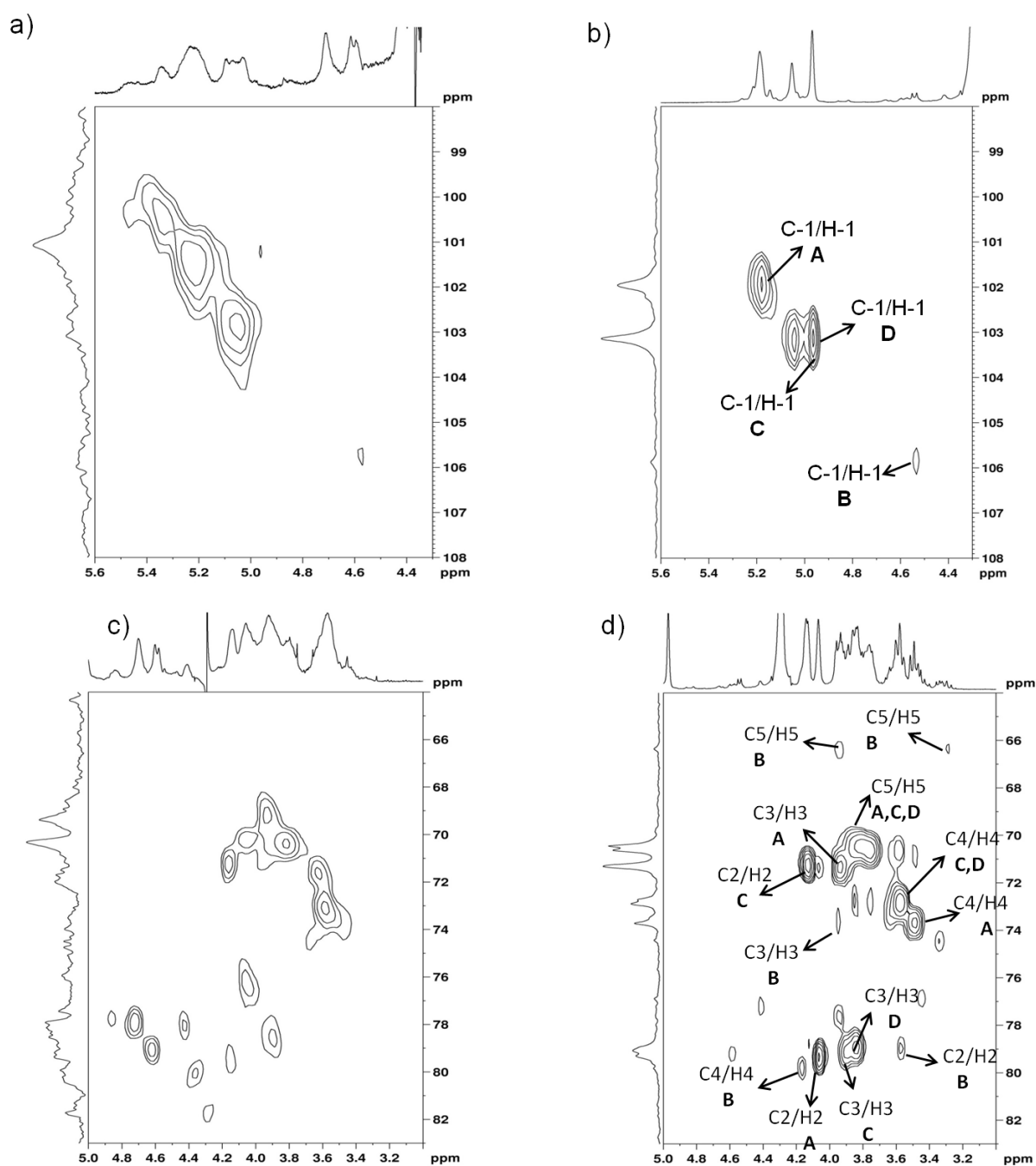


FIGURA 31 – ESPECTROS DE HSQC DA FRAÇÃO NATIVA OX-7Sd (a) e (c) E DESSULFATADA OX-7SdD (b) e (d).

NOTA: Solvente: D_2O (70°C, pH 7); acetona como padrão interno (^{13}C = 31,45 ppm, ^1H = 2,225 ppm)
 A = $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow)]$, B = $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow)]$, C = $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)]$, D = $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 2)]$

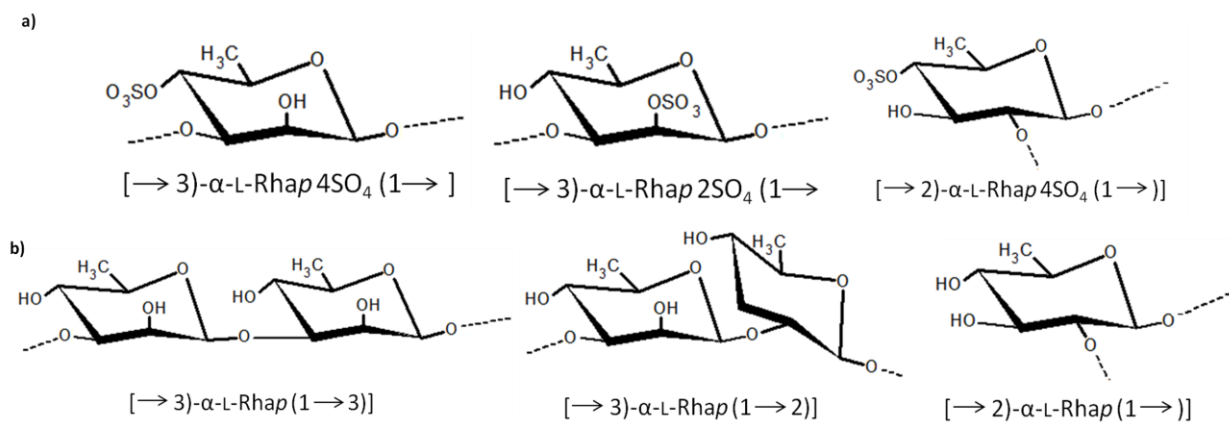


FIGURA 32- a) PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA FRAÇÃO OX-7Sd b) PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA FRAÇÃO OX-7SdD

TABELA 12- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ASSINALADOS A PARTIR DOS ESPECTROS MONO E BIDIMENSIONAIS DA FRAÇÃO DESSULFATADA OX-7SdD

Unidades de ramnose	Deslocamentos químicos (ppm)						Deslocamentos químicos (ppm)					
	C-1	H-1	C-2	H-2	C-3	H-3	C-4	H-4	C-5	H-5	C-6	H-6
[→3)-α-L-Rhap 4SO ₄ (1→]	103,1	5,07	71,4	4,15			80,3	4,37	69,4	3,94	18,2	1,36
[→3)-α-L-Rhap 2SO ₄ (1→]	100,2	5,47										
	100,5	5,35	78,4	4,71	76,0	4,07	73,1	3,60	70,2	3,81	18,2	1,36
[→3)-α-L-Rhap-(1→]	103,1	5,07	71,4	4,15	79,3	4,15	73,1	3,60	70,2	3,81	18,2	1,36
[→2)-α-L-Rhap 4SO ₄ (1→]	101,1	5,27					81,7	4,29	68,3	3,94	18,2	1,36

TABELA 13- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ASSINALADOS A PARTIR DOS ESPECTROS MONO E BIDIMENSIONAIS DA FRAÇÃO DESSULFATADA OX-7SdD

Unidades de ramnose	Deslocamentos químicos (ppm)						Deslocamentos químicos (ppm)					
	C-1	H-1	C-2	H-2	C-3	H-3	C-4	H-4	C-5	H-5	C-6	H-6
[→3)-α-L-Rhap-(1→3)] ^a	103,1	5,07	71,3	4,16	79,3	3,94	72,9	3,61	70,6	3,76-3,88	17,9	1,27-1,32
[→3)-α-L-Rhap-(1→2)] ^a	103,1	4,97	71,3	4,16	79,1	3,86	72,9	3,61	70,6	3,76-3,88	17,9	1,27-1,32
[→2)-α-L-Rhap-(1→)] ^a	102,0	5,19	79,3	4,08	71,3	3,95	73,8	3,52	70,6	3,76-3,88	17,9	1,27-1,32

^aAssinalamentos de acordo com Senchenkova *et al.* (1999), Ovod *et al.* (2004) e Cassolato *et al.* (2008).

7 DISCUSSÃO FINAL

Macroalgas marinhas produzem uma gama estrutural diversificada de polissacarídeos sulfatados, aos quais já foram descritas diversas atividades biológicas, dentre elas a atividade antitumoral (HARADA e MAEDA, 1998; KWON e NAM, 2007; LEIRO *et al.*, 2007; CASSOLATO *et al.*, 2008; MAO *et al.*, 2009; HASSAN. *et al.*, 2011).

Em um estudo prévio realizado no Laboratório de Química de Carboidratos – Algas Marinhas - por Ropelatto (2011), foram obtidas de *G. oxysperma*, heteroramnanas sulfatadas (OX-6) que após degradação controlada de Smith (OX-6S) e fracionamento cromatográfico originaram duas subfrações principais: OX-6Sb e OX-6Sc. Essas frações polissacarídicas apresentaram potente atividade antitumoral contra a linhagem de glioma humano U87MG, chegando a 81,7 % de redução de viabilidade após tratamento com a fração OX-6 na dose de 1000 µg/mL durante 72 horas. As frações OX-6Sb e OX-6Sc apresentaram diferenças na redução da viabilidade celular, sendo esta última mais citotóxica que a primeira. A atividade citotóxica destes produtos de degradação controlada de Smith foi correlacionada com o grau de sulfatação, posicionamento dos grupos sulfato ao longo do polímero e massa molar.

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo investigar os mecanismos pelo qual as heteroramnanas sulfatadas e seus produtos obtidos por degradação controlada de Smith provocam a redução na viabilidade de células de glioma humano, além de relacionar essa atividade com as diferenças estruturais apresentadas pelas frações.

Para tanto, o primeiro passo consistiu em avaliar se essas heteroramnanas sulfatadas são capazes de modular a progressão do ciclo celular. O tratamento com as frações polissacarídicas na concentração de 100 µg/mL durante 48 horas provocou um aumento na porcentagem de células na fase G1 do ciclo celular e não alterou o número de células em sub-G1 (figura 9), sugerindo que as heteroramnanas

e seus produtos de menor massa molar exercem sua atividade antitumoral por induzir parada de proliferação celular.

Esse resultado difere do que é comumente observado para polissacarídeos sulfatados obtidos de macroalgas, os quais, em sua maioria ocasionam morte celular. Polissacarídeos sulfatados obtidos de macroalgas de diferentes filos foram capazes de induzir a apoptose através da ativação de caspases. Essa ativação foi atribuída ao aumento da expressão de fatores pró-apoptóticos e diminuição dos fatores antiapoptóticos tanto da via intrínseca quanto da via extrínseca (KWON e NAM, 2006; HYUN *et al.*, 2009; KIM *et al.* 2010; ALE *et al.*, 2011;).

Fucanas induziram apoptose em linhagens de câncer de colon mesmo em baixas doses, como 10 µg/ml por 72 horas, sendo que mesmo no tempo de 24 horas, usando uma maior concentração de polissacarídeo (100 µg/ml) já foi possível observar morte celular após o tratamento (HYUN *et al.*, 2009; KIM *et al.* 2010). Já para linhagens de melanoma, a concentração de fucanas onde foi observado indução de apoptose foi maior (200 µg/ml) (ALE *et al.*, 2011). Porfiranas apresentaram significativa indução de apoptose na concentração de 0,25 % por 24 horas de tratamento em linhagens AGS (Câncer gástrico) (KWON e NAM, 2006).

Comparando as doses e os tempos nos quais foram observados indução de apoptose para esses polissacarídeos, é possível notar que eles não se diferem muito das condições utilizadas no nosso trabalho (100 µg/ml por 48 horas). Ainda, é interessante pontuar que Ropelatto (2011) não observou indícios de células mortas (células desaderidas da placa) mesmo na dose de 1000 µg/ml por 72 horas.

Destaca-se, no entanto que alguns polissacarídeos sulfatados ocasionam parada de proliferação celular. Este fenótipo foi observado para linhagens de carcinoma broncopulmonar de células não pequenas (NSCLC-N6) quando tratadas com polissacarídeos de *Schizymenia dubyi* na concentração de 60 µg/ml por 72 horas. Também foi observado um aumento de células na fase G1 para linhagens 1301, de leucemia linfoblástica, após o tratamento com polissacarídeos de *Sargassum latifolium* (10 µg/ml por 12 horas). O primeiro parou o ciclo celular na fase G1, enquanto o segundo inibiu a proliferação na fase S (BOURGOUGNON *et al.*, 1994; GALMAL-ELDEEN; AHMED e ABO-ZEID, 2009).

Há relatos de inibição da proliferação celular para polissacarídeos obtidos de outras fontes. Polissacarídeos obtidos da parede intracelular do fungo *Ganoderma lucidum* e D-glucanas produzidas pelo fungo parasita *Armillaria mellea* induziram parada na fase G1 do ciclo em células de hepatoma humano HepG2 (2000 µg/ml por 24, 48 e 72 horas) e de câncer de pulmão A549 (200 µg/ml por 24 horas) respectivamente (LIU *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2012). Polissacarídeos extraídos do fruto de *Lycium barbarum* bloquearam o ciclo celular de células HeLa na fase S (ZHU *et al.*, 2012). O polissacarídeo obtido de *Radix hedysari*, uma semente da leguminosa *Hedysarum polybotrys*, quando sulfatado quimicamente induz parada em G1 para as linhagens A549 e BGC-823 (células de câncer gástrico) na concentração de 200 µg/ml por 48 horas (WEI *et al.*, 2012).

Mas é importante destacar que o polissacarídeo pode ter diferentes ações dependendo da linhagem celular utilizada. Além disso, diferenças estruturais também podem influenciar o mecanismo de ação. Em relação a atividade antitumoral de polissacarídeos contra linhagens de gliomas, essa atividade foi observada para polissacarídeos de *Pulsatilla chinensis* contra linhagens C6 de glioma de murino, porém, o mecanismo de ação desses polissacarídeos não foi descrito (ZHOU *et al.*, 2012).

A análise de ciclo celular com as heteroramnanas de *G. oxysperma* indicou que o tratamento das células de gliomas humano com as frações polissacarídicas ocasionou parada de proliferação, sem levar à morte celular, sugerindo um efeito citostático. Para reforçar esta hipótese, foi realizado um ensaio de recuperação das células de glioma após o tratamento com o polissacarídeo, onde foi mensurado o potencial de recuperação das células. Os resultados apresentados pela linhagem U87MG mostraram que após a interrupção do tratamento as células voltaram a proliferar de maneira similar às células da condição controle. Este resultado sugere que, se esses polissacarídeos estivessem causando um dano muito agressivo nas células (que pudesse promover eventos de necrose ou apoptose) a capacidade de recuperação das células tratadas seria afetada, o que não foi evidenciado por estas análises (figura 11).

Em relação ao efeito das heteroramnanas sulfatadas e seus produtos de menor massa molar, o tratamento com as diferentes frações polissacarídicas provocou diminuição na percentagem de células que migraram em direção ao risco no ensaio do *scratch in vitro*. Porém, essa diminuição foi atribuída a redução na viabilidade celular, pois normalizando esses dados verificou-se que não há diferença significativa na taxa de migração das células que receberam o tratamento com o polissacarídeo quando comparadas com a condição controle (figura 14).

Há descrito na literatura que polissacarídeos obtidos de diversas fontes são capazes de reduzir a migração de diferentes linhagens tumorais, porém, a maioria destes estudos não normalizam os dados de migração com os resultados de viabilidade celular. Assim, não é possível diferenciar se esse polissacarídeos realmente impedem que a célula migre ou se essa redução na migração celular é consequência do seu efeito citotóxico.

Polissacarídeos obtidos da planta *Codonopsis pilosula* diminuíram a migração (*wound migration assay*) de células HO-8190 (carcinoma humano de ovário) em aproximadamente 40 %. Ao avaliar o efeito citotóxico destes polímeros, o valor obtido foi em torno de 35 %, ou seja, muito próximo daquele encontrado na redução da migração celular. Provavelmente esses polissacarídeos não estão agindo diretamente na migração dessas células e a redução da percentagem de células que migraram pode ser atribuído ao efeito citotóxico dessas moléculas (XIN *et al.*, 2012). O mesmo fato pode ocorrer em relação ao efeito dos polissacarídeos planta *Panax ginseng* em células T24 (câncer de bexiga) (LI *et al.*, 2012). Já a pectina obtida desta mesma espécie de planta diminuiu a migração celular de linhagens L-929 (fibroblasto embrionário de rato) e HT-1080 em 30 e 56 % respectivamente, porém não foram capazes de provocar diminuição na percentagem de células viáveis. Portanto nesse caso é possível afirmar que essas pectinas promovem parada de migração das células (FAN *et al.*, 2010). Os polissacarídeos de *Sepiella maindroni*, além de terem provocado uma diminuição de aproximadamente 50 % na proliferação de células SKOV3 (carcinoma de ovário humano) e ECV 304 (células de veias entoteliais humanas), inibiram a migração em até 89,6 %. Foi demonstrado ainda

que esse compostos inibem a metaloprotease tipo 2 (MMP-2), um grupo de enzimas relacionadas ao processo de invasão em quase todos os tipos de tumores (WANG et al., 2008).

Portanto, dependendo da estrutura química destes polímeros e das linhagens celulares utilizadas, polissacarídeos podem agir inibindo a migração celular. Porém, as heteroramnanas sulfatadas de *G. oxysperma* não agem diretamente nesse processo em células U87MG e a redução na taxa de migração celular provocada por esses compostos deve ser atribuída ao seu grande potencial citotóxico.

Outros compostos mostraram-se capazes de inibir a migração da linhagem U87MG como por exemplo flavonoides (quercetina) a qual apresentou essa atividade na concentração de 50 μ M, através da inibição da MMP-2 (AMSTALDEN, 2011).

Assim, os dados de atividade biológica demonstram que as heteroramnanas sulfatadas de *G. oxysperma* e seus produtos de menor massa molar exercem redução na viabilidade das linhagens de glioma através da inibição da proliferação celular com parada de ciclo na fase G1 o que foi confirmado através da análise de expressão gênica, a qual mostrou tendência de modulação de p21, inibidor de CDKs da fase G1/S (figura 15).

Há descrito na literatura que polissacarídeos obtidos de plantas são capazes de aumentar a expressão de p21. Polissacarídeos de *Phasilus vulgaris* nas concentrações de 5,0 %, 7,5 %, 10,0 %, 20,0 % e 25,0 %, regularam a expressão gênica de mais de 72 genes em células HT-29, dentre eles, p21 (CAMPOS-VEGA et. al., 2010). Células MDA-MB-231(câncer de mama) também mostraram aumento de expressão de p21 após o tratamento com 1,5 mg/ml de polissacarídeos de *Vorolus versicolor* por 1-5 dias (CHOW et. al., 2003). Foi observado aumento da expressão dos marcadores p53 e p21 para células HepG2 tratadas com 200 μ g/ml de polissacarídeos quimicamente sulfatados obtidos de *Pinus massoniana* por 72 horas. Porém, diferentemente do presente trabalho, os polissacarídeos de *P. massoniana* induziram parada de proliferação celular na fase G2/M (CHU et. al.,

2013). Os trabalhos citados não apresentam a determinação da estrutura química dos polissacarídeos estudados, não podendo ser feita assim, uma melhor comparação destes resultados com os obtidos no presente trabalho.

Ao determinar a atividade antitumoral das heteroramnanas de *G. oxysperma*, Ropelatto (2011) observou diferenças na citotoxicidade entre as duas frações obtidas a partir do produto de degradação de Smith (OX-6S): OX-6Sb e OX-6Sc, o que foi correlacionado com as diferenças estruturais destas frações. Porém, apesar das diferenças estruturais influenciarem a redução na viabilidade celular, no presente trabalho os resultados mostram que esse fator não influencia o mecanismo de ação destes polissacarídeos.

Em relação a estrutura, a primeira diferença observada entre as duas frações refere-se ao teor de grupos O-sulfato. A fração OX-6Sc, que mostrou-se mais citotóxica entre os produtos de degradação controlada de Smith possui 42,8 % de grupamentos sulfato, enquanto OX-6Sb possui 33,7 %.

Sabe-se, através de dados da literatura, que um fator determinante para a atividade antitumoral de polissacarídeos é a presença de grupos sulfato. Fucanas sulfatadas quimicamente apresentaram uma maior redução na viabilidade de células AGS *in vitro* (37,3-68,0 %) quando comparadas com fucanas sulfatadas nativas (19,2 – 57,5 %) na concentração de 0,2 a 0,8 mg/ml (CHO *et al.*, 2011). Já o contrário, a dessulfatação dessas moléculas reduz drasticamente a sua atividade biológica (HAROUN-BOUHEDJA *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2011). Ainda, células HeLa apresentaram maior diminuição na viabilidade celular quando tratadas com a fração polissacarídica com maior teor de grupo sulfato obtida da macroalga vermelha *Amansia multifida* (SOUZA *et al.*, 2012).

Porém, somente o teor de grupamentos sulfato não é suficiente para justificar a maior citotoxicidade da fração OX-6Sc quando comparada com OX-6Sb. É importante considerar que a fração original, OX-6S, possui 34,3 % de grupos sulfato, ou seja, semelhante ao que foi encontrado para OX-6Sb, e mesmo assim apresenta

maior redução na viabilidade celular que seus produtos de menor massa molar OX-6Sb e OX-6Sc.

Seguindo a estratégia experimental de determinação da estrutura química, as análises de metilação realizadas por Ropelatto (2011) mostraram que apesar de OX-6Sb e OX-6Sc apresentarem os mesmos derivados metilados, a última fração possui uma maior quantidade de unidades de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas e 2-ligadas 3,4-sulfatadas, quando comparado com OX-6Sb.

Dando continuidade aos estudos estruturais das frações OX-6Sb e OX-6Sc, a fração OX-6Sc-R (fração carboxi-reduzida obtida a partir de OX-6Sc foi submetida a análise de trideuteriometilação, a qual consiste na metilação com ICH_3 seguida de dessulfatação e metilação com ICD_3). A análise do perfil de fragmentação dos derivados de ramnose confirmaram os resultados estruturais previamente obtidos.

Além de investigar o mecanismo de atividade antitumoral das heteroramnanas de *G. oxysperma*, novas frações polissacarídicas (OX-7S) foram obtidas por degradação controlada de Smith a partir de heteroramnanas sulfatadas (OX-7). A metodologia de cromatografia de troca iônica foi eficaz no fracionamento de OX-7S gerando duas frações com teores de grupos sulfato similares aos das frações OX-6b e Ox-6c. A fração principal OX-7Sd obtida no presente trabalho é altamente sulfatada (42,8 %) e constituída majoritariamente por ramnose (95,1 %), e menores percentagens de glucose (2,6 %), xilose (1,5 %) e traços de arabinose e galactose. Deste modo os principais produtos de degradação controlada de Smith gerados no presente trabalho são similares aos obtidos previamente. Deste modo estes resultados indicam que a metodologia utilizada para gerar fragmentos de menor massa molar altamente sulfatados, a partir de heteroramnanas sulfatadas de *G. oxysperma* representam uma ferramenta adequada para a obtenção de compostos bioativos.

8 CONCLUSÕES

Os resultados mostram que heteroramnanas sulfatadas e seus produtos de menor massa molar obtidos de *G. oxysperma* são capazes de modular a progressão do ciclo celular promovendo um aumento da porcentagem de células na fase G1. Na análise do ciclo celular não foi observado a presença de células em sub-G1, ou seja não foi observado a presença de células contendo DNA fragmentado. Esses dados sugerem que esses polissacarídeos não são capazes de induzir a morte dessas células. Também foi observado que esses polímeros não inibem a migração e não alteram a taxa de proliferação celular após a retirada do tratamento.

As frações OX-6, OX-6S e OX-6Sc, apresentaram perfil semelhante ao que diz respeito a parada de progressão do ciclo celular, efeito na migração e recuperação da taxa de proliferação após suspensão do tratamento. Assim, pode-se dizer que as diferenças estruturais apresentadas por essas frações não influenciam o mecanismo de ação antitumoral desses polissacarídeos. Porém, conforme observado por Ropelatto (2011), diferenças estruturais estão relacionadas com a redução da viabilidade celular entre essas frações, onde a fração OX-6Sb se mostrou menos citotóxica. As diferenças estruturais foram confirmadas através da análise do perfil de fragmentação dos derivados de ramnose.

Ainda, novas frações potencialmente bioativas foram obtidas de *G. oxysperma*, as quais foram caracterizadas quimicamente. A fração de maior rendimento obtida após o fracionamento em DEAE-Sephacel do produto de degradação controlada de Smith mostrou ser composto majoritariamente por ramnose, além de possuir elevados teores de sulfato, assim como observado para os produtos obtidos por Ropelatto (2011).

REFERÊNCIAS

- ABTA - American Brain Tumor Association. Disponível em: <[http://www.abta.org/Tumor & Treatment Info/Gliomas/230](http://www.abta.org/Tumor%20&%20Treatment%20Info/Gliomas/230)>. Acesso em 10/10/2011
- AGGARWAL BB: Signalling pathways of the TNF superfamily: a doubleedged sword. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 745-756, 2003.
- ALE, M.T.; MARUYAMA, H.; TAMAUCHI, H.; MIKKELSEN, J.D.; MEYER, A.S. Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds Inhibit Proliferation of Melanoma Cells and Induce Apoptosis by Activation of Caspase-3 *in Vitro*. **Mar. Drugs**, v. 9, p. 2605-2621, 2011.
- AMSTALDEN, H.G. **Efeitos da quercitina em células de glioma humano:envolvimento de metaloproteínas de matriz e seus inibidores**. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- ANASTYUK, S.D.; SHEVCHENKO, N.M.; ERMAKOVA S.P.; VISHCHUK O.S.; NAZARENKO E.L.; DMITRENOKP.S.; ZVYAGINTSEVA, T.N. Anticancer activity in vitro of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* and its low-molecular fragments, structurally characterized by tandem mass-spectroscopy. **Carbohydr. Polym.**, v. 87, p. 186-194, 2012.
- ARELLANO, M.; MORENO, S. Regulation of CDK/cyclin Complexes During the CellCycle. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 29, n. 4, p. 559-573, 1997.
- BACKINOWSKY, L.V.; BALAN, M.F.; SHASHKOV, A.S.; KOCHETKOV, N.K. Synthesis and ¹³C-N.M.R. spectra of α-L-rhamnopyranosides. **Carbohydr. Res.**, v. 84, p. 225-235, 1980.
- BLEEKER, F. E. et al. Absence of AKT1 mutations in glioblastoma. **PLoS One**. v. 4, n. 5, p. 5638, 2009.
- BOURGOUGNON, N.; ROUSSAKIS, C.; KORNPORST, J.; LAHAYE, M. Effects *in vitro* of sulfated polysaccharide from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales). **Cancer Letters**, v.85, p. 87-92, 1994
- BRADING, J.W.E.; GEORG-PLANT, M.M.T.; HARDY, D.M. The polysaccharide from the alga *Ulva lactuca*. Purification, hydrolysis, and methylation of the polysaccharide. **J. Chem. Soc.**, p. 319-324, 1954.
- CAMPOS-VEGA, R.; GUEVARA-GONZALEZ, R.G.; GUEVARA-OLVERA, R.G.; OOMAH, B.D.; LOARCA-PINA, G. Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polysaccharides

modulate gene expression in human colon cancer cells (HT-29). **Food Res. Int.**, v.43, p. 1057–1064, 2010.

CASSOLATO, J. E. F. **Determinação da estrutura química e atividade biológica de heteroramnanas sulfatadas obtidas de macroalgas verdes (Ulvaes-Chlorophyta)**. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CASSOLATO, J. E. F.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; PELLIZZARI, F. M.; DAMONTE, E. B.; DUARTE, M. E. R. Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. **Carbohydr. Res.**, v. 343, p. 3085–3095, 2008.

CASTRO, R.; PIAZZON, M.C.; ZARRA, I.; LEIRO, J.; NOYA, M.; LAMAS, J. Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. **Aquacult.**, v. 254, p. 9-20; 2006.

CHABNER, B. A. *et al.* Agentes Antineoplásicos. In: BRUTON, L. L. *et al.* (Comp.). **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-hill, 2006. Cap. 51, p. 1185-1264.

CHARLES, A.L.; CHENG, K.C.; MEI-LI, W.; HUANG, T.C. Studies on the expression of liver detoxifying enzymes in rats fed seaweed (*Monostroma nitidum*). **Food and Chem. Toxicol.**, v.45, p. 2390–2396, 2007.

CHEN, F.; WANG, W.; EL-DEIRY, W.S. Current strategies to target p53 in cancer. **Biochem. Pharmacol.**, v. 80, n. 5, p. 724-730, 2010.

CHEN, X.; NIE, W.; YU, G.; LI, Y.; HU, Y.; LU, J.; JIN, L. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Sargassum Fusiforme*. **Food and Chem. Toxicol.**, v. 50, p. 695–700, 2012.

CHO, M.L.; LEE, B.; YOU, S. Relationship between Oversulfation and Conformation of Low and High Molecular Weight Fucoidans and Evaluation of Their *in Vitro* Anticancer Activity. **Molecules**, v.16, p. 291-297, 2011.

CHO, M.; YANG, C.; KIM, S.; YOU, S. Molecular Characterization and Biological Activities of Watersoluble Sulfated Polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 19, n.2, p. 525-533, 2010.

CHOW, L.W.C.; LO, C.S.Y.; LOO, W.T.Y.; HU, X.; SHAM, J.S.T. Polysaccharide Peptide Mediates Apoptosis by Up-regulating p21 Gene and Down-regulating Cyclin D1 Gene. **The American J. of Chinese Med.**, v.31, n. 1, p.1–9, 2003.

CHU, H.; MAO, H.; FENG, W.; LIU, J.; GENG, Y. Effects of sulfated polysaccharide from Masson pine (*Pinus assoniana*) pollen on the proliferation and cell cycle of HepG2 cells. **Int. J. of Biol. Macromol.**, v.55, p. 104– 108, 2013.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1984.

CORRÊA, J. B. C. **Métodos químicos para a determinação de estrutura de polissacarídeos**. 1971. 62 p. Datilografado.

COSTA, L.S.; TELLES, C.B.S.; OLIVEIRA, R.M.; NOBRE, L.T.D.B.; SANTOS, N.D.; CAMARA, R.B.G.; COSTA, M.S.S.P.; LIMA, J.A.; MELO-SILVEIRA, R.F.; ALBUQUERQUE, I.R.L.; LEITE, E.L.; ROCHA, A.O. Heterofucan from *Sargassum filipendula* induces apoptosis in HeLa Cells. **Mar. Drugs**, v.9, p. 603-614, 2011.

DARZYNKIEWICZ, Z. *et al.* Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, n. 8, p. 795-808, 1992.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the sulphate ester of sulphated polysaccharide. **Biochem. J.**, v. 84, p. 106-110, 1962.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ENGELMAN, J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, n. 8, p.550-562, 2009.

FAN, Y.; CHENG, H.; LI, S.; WANG, J.; LIU, D.; HAO, M.; GAO, X.; FAN, E.; TAI, G.; ZHOU, Y. Relationship of the inhibition of cell migration with the structure of ginseng pectic polysaccharides. **Carbohydr. Polym.**, v. 81, p. 340–347, 2010.

FELDKAMP MM, LALA P, LAU N, RONCARI L, GUHA A. Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. **Neurosurg.**, v. 45, p. 1442-1453, 1999.

FERNÁNDEZ, L.E.; VALIENTE, O.G.; MAINARDI, V.; BELLO, J.L. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANTITUMOR ACTIVE AGAR-TYPE POLYSACCHARIDE OF *Gracilaria domingensis*. **Carbohydr. Res.**, v. 190 p. 77-83, 1989.

FURNEAUX, R.H.; STEVENSON, T.T. The xylogalactan sulfate from *Chondria macrocarpa* (Ceramiales, Rhodophyta). **Hydrobiologia**, v., 204-205, p. 615-620, 1990.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Anal. Biochem.**, v. 197, p. 157-162, 1991.

GALMAL-ELDEEN, A.M.; AHMED,E.F.; ABO-ZEID, M.A. *In vitro* cancer chemopreventive properties of polysaccharide extract from the brown alga, *Sargassum latifolium*. **Food and Chem.Toxicol.**, v. 47, p. 1378-1384, 2009.

GOLDSTEIN, I. J.; HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Eds.). **Methods Carbohydr. Chem.**, Academic Press, New York, v. 5, p. 361-369, 1965.

GORAD, M.; DÉCORDÉ, K.; VENTURA, E.; SOTERAS, G.; BACC OU, J.C. Polysaccharides from the green alga *Ulva rigida* improve the antioxidant status and prevent fatty streak lesions in the high cholesterol fed hamster, an animal model of nutritionally-induced atherosclerosis. **Food Chem.**, v. 115, p. 176–180, 2009.

GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Can. J. Chem.**, v. 53, p. 1212-1223, 1975.

GUERRERO, R.; LÓPEZ, I.L.; CARTIER, L.R. Glioma multifocal multicéntrico. **Rev Chil Neuro-Psiquiat.**, v. 48, n. 3, p. 213-218, 2010.

HAQ, Q. N.; PERCIVAL, E. In **Some Contemporary Studies in Marine Science**; Barnes, H., Ed.; Allen and Unwin Ltd.: London, p. 355-368, 1966.

HARADA, N.; MAEDA, M. Chemical structure of antithrombin-active rhamnan sulfate from *Monostroma nitidum*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 62, p. 1647-1652, 1998.

HARPER, J.W.; ELLEDGE, S. Cdk inhibitors in development and cancer. **Current Opin. in Gen Devel.**, v.6, n.1, p. 56-64, 1996.

HAROUN-BOUHEDJA, F., ELLOUALI, M., SINQUIN, C., BOISSON-VIDAL, C. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. **Thrombosis Res.**, v.100, p. 453–459, 2000.

HASSAN, S. EL-TWAB, S.A.; HETTA, M.; MAHMOUD, B. Improvement of lipid profile and antioxidant of hypercholesterolemic albino rats by polysaccharides extracted from the green alga *Ulva lactuca Linnaeus*. **Saudi J. of Biol. Sci.**, v.18, n.4, p. 333-340, 2011.

HOEK, C.V.D.; MANN D.G.; JAHNS, H.M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge University Press, 1995.

HULLEMAN, E.; HELIN, K. Molecular mechanisms in gliomagenesis. **Adv Cancer Res**, v. 94, p.1-27, 2005.

HYUN, J.H.; KIM, S.C.; KANG, J.I.; KIM, M.K.; BOO, H.J.; KWON, J.M.; KOH, Y.S.; HYUN, J.W.; PARK, D.B.; YOO, E.S.; KANG, H.K. Apoptosis Inducing Activity of Fucoidan in HCT-15 Colon Carcinoma Cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v.32, n. 10, p. 1760-1764, 2009.

HWANG, H.J.; KNOW, M.J.; KIM, I.H.; NAM, T.J. The effect of polysaccharide extracted from the marine alga *Capsosiphon fulvescens* on ethanol administration. **Food Chem Toxicol.**, v. 46, p. 2653-2657, 2008.

ISHII, T.; KONISHI, T.; ONO, H.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; TOGASHI, H.; SHIMIZU, K. Assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of 2-minobenzamide-labeled xylo-oligosaccharides. **Carbohydr. Pol.**, v.74, p.579–589, 2008,

JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDRGREN, H.; LINDBERG, B.; JÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chem. Commun.**, v. 8, p. 1-71, 1976.

JANSSON, P.E.; KENNE, L.; WIDMALM, G. Computer-assisted structural analysis of polysaccharides with an extended version of CASPER using ^1H - and ^{13}C -N.M.R. data. **Carbohydr. Res.**, v. 188, p. 169-191, 1989.

JORDÃO, B.Q.; ANDRADE, C.G.T.J. O ciclo celular. In: JUNQUEIRA e CARNEIRO. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KARIN, M. et al. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 4, p.301-310, 2002.

KARNJANAPRATUM, S.; TABARSA, M.; CHO, M. YOU, S. Characterization and immunomodulatory activities of sulfated polysaccharides from *Capsosiphon fulvescens*. **Int. J. of Biol. Macromol.**, v.51, p. 720– 729, 2012.

KARNJANAPRATUM, S; YOU, S. Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their in vitro anticancer and immunomodulatory activities. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 48, p. 311-318, 2011.

KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**. v. 26, p .239 – 257, 1972.

KIECHLE FL, ZHANG X. Apoptosis: a brief review. **J Clin Ligand Assay**. v. 21 p. 58 – 61, 1998.

KNIREL, Y. A.; OVOD, V. V.; ZDOROVENKO, G. M.; GVOZDYAK, R. I.; KROHN, K. J. Structure of the O-polysaccharide and immunochemical relationships between the lipopolysaccharides of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato and pathovar maculicola. **Eur. J. Biochem.**, v. 258, p. 657-661, 1998a.

KIM, E.J.; PARK, S.Y.; LEE, J.Y.; PARK, J.H.Y. Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. **BMC Gastroenterol.**, v. 10, n. 96, 2010.

KIM J.K.; MYOUNG,L.C.; KARNJANAPRATUM, S.; SHIN, I.S.; YOU,S,G. A. *In vivo* and *in vitro* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 49, n. 5, p. 1051-1058, 2011.

KRAKSTAD, C.; CHEKENYA, M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. **Mol. Cancer**, v. 135, n. 9, p. 1-14, 2010.

KWON, M.J.; NAM, T.J. Porphyrin induces apoptosis related signal pathway in AGS gastric cancer cell lines. **Life Sci.**, v. 79, p. 1956–1962, 2006.

KWON, M.J.; NAM, T.J. A polysaccharide of the marine alga *Capsosiphon fulvescens* induces apoptosis in AGS gastric cancer cells via an IGF-IR-mediated PI3K/Akt pathway. **Cell. Biol. Int.**, v. 31, p. 768-775, 2007.

LAHAYE, M. NMR spectroscopic characterization of oligosaccharides from two *Ulva rigida* samples (Ulvales, Chlorophyta) degraded by a lyase. **Carbohydr. Res.**, v. 314, p. 1-12, 1998.

LAHAYE, M.; AXELOS, M.A.V. Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva* spp.). **Carbohydr. Polym.**, v. 22, p. 261-265, 1993.

LAHAYE, M.; CIMADEVILLA, E.A.-C.; KUHLENKAMP, R.; QUEMENER, B.; LOGNONÉ, V.; DION, P. Chemical composition and ¹³C NMR spectroscopic characterization of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). **J. Appl. Phycol.**, v.11, p. 1-7, 1999.

LAHAYE, M.; INIZAN, F.; VIGOUROUX, J. NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan-boron complex formation. **Carbohydr. Polym.**, v. 36, p 239-249, 1998.

LAHAYE, M.; RAY, B. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta) – NMR analysis of ulvan oligosaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 283, p. 161-173, 1996.

LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweed. **Biomacromol.**, v. 8, p. 1765-1774, 2007.

LEE, J. B.; HAYASHI, K.; MAEDA, M.; HAYASHI, T. Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae. **Planta Med**, v. 70, p. 813-817, 2004.

LEE, J.B.; HAYASHI, K.; MAEDA, M.; HAYASHI, T. Structure of rhamnan sulfate from the green alga *Monostroma nitidum* and its anti-herpetic effect. **Carbohydr. Polym.**, v. 81, p. 572-577, 2010.

LEE, J.B.; OHTA, Y.; HAYASHI, K.; HAYASHI, T. Immunostimulating effects of a sulfated galactan from *Codium fragile*. **Carbohydr. Res.**, v. 345, p. 1452-1454, 2010.

LEE, J.B.; YAMAGAKI, T.; MAEDA, M.; NAKANISHI, H. Rhamnan sulfate from cell walls of *Monostroma latissimum*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 921-925, 1998.

LEIRO, J.M.; CASTRO, R.; ARRANZ, J.A.; LAMAS J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. **Int. Immunopharmacol.**, v. 7, p. 879-888, 2007.

LI, C. CAI, J.; GENG, J.; LI, W.; WANG, Z.; LI, R. Purification, characterization and anticancer activity of a polysaccharide from *Panax ginseng*. **Int. J. of Biol. Macromol.**, v. 51, p. 968-973, 2012.

LI, H.; MAO, W.; CHEN, Y.; REN, S.; QI, X.; CHEN, Y.; ZHAO, C.; LI, N.; WANG, C.; LIN, C.; MENGXIA, Y.; SHAN, J. Sequence analysis of the sulfated rhamno-oligosaccharides derived from a sulfated rhamnan. **Carbohydr. Polym.**, v. 90, p. 1299-1304, 2012.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nat. Protoc.**, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

LIPKIND, G.M.; SHASHKOV, A.S.; KNIREL, Y.A.; VINOGRADOV, E.V.; KOCHETKOV, N.K. A computer-assisted structural analysis of regular polysaccharides on the basis of ¹³C-N.M.R. data. **Carbohydr. Res.**, v. 175, p. 59-75, 1988.

LIU, Y.; SHEN, J.; XIA, Y.; ZHANG, J.; PARK, H. The polysaccharides from *Ganoderma lucidum*: Are they always inhibitors on human hepatocarcinoma cells?. **Carbohydr. Polym.**, v.90, n. 3, p. 1210-1215, 2012.

LOCKSLEY, R.M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, p. 487-501, 2001.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, K.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAEDA, M.; UEHARA, T.; HARADA, N.; SEKIGUCHI, M.; HIRAOKA, A. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their distribution in the Chlorophyta. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3611-3614, 1991.

MAGALHÃES, K.D.; COSTA, L.S.; FIDELIS, G.P.; OLIVEIRA, R.M.; NOBRE, L.T.D.B.; DANTAS-SANTOS, N.; CAMARA, R.B.G.; ALBUQUERQUE, I.R.L.; CORDEIRO, S.L.; SABRY, D.A.; COSTA, M.S.S.P.; ALVES, L.G.; ROCHA, H.A.O. Anticoagulant, Antioxidant and Antitumor Activities of Heterofucans from the Seaweed *Dictyopteris delicatula*. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 12, p. 3352-3365, 2011.

MAO, W.; LI H.; ZHANG H.; QI, X.; SUN, H. Chemical characteristic and anticoagulant activity of the sulfated polysaccharide isolated from *Monostroma latissimum* (Chlorophyta). **Int. J. Biol. Macromol.**, v.44, p. 70-74, 2009.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; BACIC, A.; LIAO, M.L.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marina green alga, *Codium cylindricum*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 28, p. 395-399, 2001.

McKINNEL, J.P.; PERCIVAL, E. Structural investigations on the water-soluble polysaccharide of the green seaweed *Enteromorpha compressa*. **J. Chem. Soc.**, p. 3141-3148, 1962a.

McKINNELL, J.P.; PERCIVAL, E. The acid polysaccharide from the green seaweed *Ulva lactuca*. **J. Chem. Soc.**, p. 398-399, 1962b.

MCLENDON, R. *et al.* Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1061-1068, 2008.

MEDCALF, D.G.; LIONEL, T.; BRANNON, J.H.; SCOTT, J.R. Seasonal variation in the mucilaginous polysaccharides from *Ulva lactuca*. **Bot. Mar.**, v. 18, p. 67-70, 1975.

MINNITI, G. *et al.* Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. **Anticancer Res.**, v. 29, n. 12, p. 5171-5184, 2009.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. of Immunolog. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MÜLLAUER, L.; GRUBER, P.; SEBINGER, D.; BUCH J.; WOHLFART, S.; CHOTT, A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. **Mutat. Res.**, v. 488, p.211– 231, 2001.

NA, Y.S.; KIM, W.J.; KIM, S.M.; PARK, J.K.; LEE, S.M.; KIM, S.O.; SYNYTSYA, A.; PARK, Y.I. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. **Int. Immunopharmacol.**, v. 10, p. 364-370, 2010.

NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of the chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **J. Biol. Chem.**, v. 86, p. 1323-1327, 1979.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4. ed. New York: Freeman, 2005. 1119 p.

NAJMAN, H.; GADELHA, M. I. P. Temozolamida. **Rev. Bras. de Cancerol.**, v. 48, n. 3, p. 439-455, 2002.

OLIVEIRA, E. C.; HORTA, P. A.; AMÂNCIO, C. E.; SANT'ANNA, C. L. Algas e angiospermas marinhas bêmicas do litoral brasileiro: diversidade, exploração e conservação. 1999. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/brnd/round6/guias/PERFURACAO/PERFURACAO_R6/refere/plantas_marinhas.pdf> Acesso em 12/09/2011.

OHTA, Y.; LEE, J.B.; HAYASHI, K.; HAYASHI, T. Isolation of Sulfated Galactan from *Codium fragile* and Its Antiviral Effect. **Biol. Pharm. Bull.** v. 32, n. 5, p. 892—898, 2009.

OVOD, V.V.; ZDOROVENKO, E.L.; SHASHKOV, A.S.; KOCHAROVA, N.A.; KNIREL, Y.A. Structural diversity of O-polysaccharide and serological classification of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* and other strains of genomospecies 4. **Microbiology**, v. 73, p. 666-677, 2004.

PARSONS *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Science**. v. 321, p.1807-1812, 2008.

PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. The polysaccharides. **New York: Academic Press**, p.195-285, 1983.

PELLIZZARI, F.M.; ABSHER, T.; YOKOYA, N.S.; OLIVEIRA, E.C. Cultivation of the edible green seaweed *Gayralia (Chlorophyta)* in southern Brazil. **J. Appl. Phycol.**, v. 19, p. 63-69, 2007.

PENG, Z.; LIU, M.; FANG, Z.; WU, J.; ZHANG, Q. Composition and cytotoxicity of a novel polysaccharide from brown alga (*Laminaria japonica*). **Carbohydr. Polym.**, v. 89, n.4, p. 1022-1026, 2012.

PENGZHAN, Y.; NING, L.; XIGUANG, L.; GEFEI, Z.; QUANBIN, Z.; PENGCHENG, L. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa (Chlorophyta)*. **Pharmacolog. Res.**, v.48, p. 543—549, 2008.

PERCIVAL, E; WOLD, J.K. The acid polysaccharides from the green seaweed *Ulva lactuca*. Part II. The site of the ester sulphate. **J. Chem. Soc.**, p. 5459- 5468, 1963.

POTÉN, J.; MACINTYRE, E. H. Long term culture of normal and neoplastic human glia. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 4, n. 74, p. 465-486, 1968.

QI, H.; LIU, X.; ZHANG, J.; DUAN, Y.; WANG, X.; ZHANG, Q. Synthesis and antihyperlipidemic activity of acetylated derivative of ulvan from *Ulva pertusa*. **Int. J. of Biol. Macromol.**, v.50, p.270–272, 2012.

QI, H.; HUANG, L.; LIU, X.; LIU, D.; ZHANG, Q.; LIU, S. Antihyperlipidemic activity of high sulfate content derivative of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (*Chlorophyta*). **Carbohydr. Polym.**, v.87, p.1637–1640, 2012.

QI H.; B ZHANG, Q.; ZHAO, T.; HU, R.; ZHANG, K.; LI, Z. *In vitro* antioxidant activity of acetylated and benzoyleated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (*Chlorophyta*). **Bioorganic & Medi. Chem. Lett.**, v. 16, p. 2441–2445, 2006.

QUEMENER, B.; LAHAYE, M.; BOBIN-DUBIGEON, C. Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. **J. Appl. Phycol.**, v. 9, p. 179-188, 1997.

RAMANA, K.S.; RAO, E.V. Structural features of the sulphated polysaccharide from a green seaweed, *Cladophora socialis*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 259- 262, 1991.

RAO, E.V.; RAO, N.V.S.A.V.P.; RAMANA, K.S. Structural features of the sulphated polysaccharide from a green seaweed, *Spongomorpha indica*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 1183-1186, 1991.

RAO, N.V.S.A.V.P.; RAMANA, K.S. Structural studies of a polysaccharide isolated from the green seaweed *Chaetomorpha anteninna*. **Carbohydr. Res.**, v. 217, p. 163-170, 1991.

RAO, N.V.S.A.V.P.; RAO, E.V. Structural features of the sulphated polysaccharide from a green seaweed, *Caulerpa taxifolia*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 1645-1647, 1986.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 344-366, 2001.

RODRIGUES, J. A.G; VANDERLEI , E.S.O.; SILVA, L. M.C.M.; ARAÚJO, I.W.F.; QUEIROZ, I.N.L.; PAULA, G. A.; ABREU, T.M.; RIBEIRO, N. A.; BEZERRA, M.M.; CHAVES, H.V.; LIMA, V.; JORGE, R.J.B.; MONTEIRO, H.S.A.; LEITE, E. L.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Pharmacolog. Rep.**, v. 64, p. 282-292, 2012.

ROPELATTO, J. **Estrutura química e atividade antitumoral de heteroramnanas sulfatadas e seus produtos de degradação parcial obtidos da macroalga verde *Gayralia oxysperma***. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

RUANO Y.; MOLLEJO, M.; CAMACHO F.I.; LOPE A.R.; FIANO C.; RIBALTA, T.; MARTINEZ, P.; HERNANDEZ-MONEO, J.L.; MELENDEZ, B. Identification of survival related genes of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma multiforme. **Cancer**. v. 112, p.1575-1584, 2008.

SATHIVEL, A.; RAGHAVENDRAN, H.R.B.; SRINIVASAN, P.; DEVAKI, T. Anti-peroxidative and anti-hyperlipidemic nature of *Ulva lactuca* crude polysaccharide on D-Galactosamine induced hepatitis in rats. **Food and Chem. Toxicol.**, v.46, p. 3262–3267, 2008.

SENCHEKOVA, S.N.; SHASHKOV, A.S.; LAUX, P.; KNIREL, Y.A.; RUDOLPH, K. The O-chain polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Xanthomonas campestris* pv. *Begoniae* GSPB 525 is a partially L-xylosylated L-rhamnan. **Carbohydr. Res.**, v. 319, p. 148-153, 1999.

SHAMSARA, J. *et al.* Association between MGMT promoter hypermethylation and p53 mutation in glioblastoma. **Cancer Invest.**, v. 27, n. 8, p. 825-829, 2009.

SIDDHANTA, A.K.; SHANMUGAM, M.; MODY, K.H.; GOSWAMI, A.M. RAMAVAT, B.K. Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs. from the west coast of India: chemical composition and blood anticoagulant activity. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 26, p. 151-154, 1999.

SOUZA, A.P.A.; TORRES, M.R.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; FILHO, F.D.R.; ALVES, A.P.N.N.; LOTUFO, L.V.C. *In vivo* inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **Carb. Pol.**, v. 69, p. 7-14, 2007.

SOUZA, L.A.R.; DORE, C.M.P.G.; CASTRO, A.J.G.; AZEVEDO, T.C.G.; OLIVEIRA, M.T.B.; MOURA, M.F.V.; BENEVIDES, N.M.B.; LEITE, E.L. Galactans from the red seaweed *Amansia multifida* and their effects on inflammation, angiogenesis, coagulation and cell viability. **Biomed. & Prev. Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 154-162, 2012.

STEVENS, A. **Patologia**, 2ª ed., São Paulo: Manole, 1998.

STEVENSON, T.T.; FURNEAUX, R.H. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. **Carbohydr. Res.**, v. 210, p. 277-298, 1991

STUPP, R *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 5, p. 459-466, 2009.

STUPP, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, n. 10, p. 987-996, 2005.

SURGH, Y.J., KUNDU, J.K., 2007. Cancer preventive phytochemicals as speed breakers in inflammatory signaling involved in aberrant COX-2 expression. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 7, 447–458, 2007.

SYNYTSYA, A.; KIM, W.; KIM, S.; POHL, R.;SYNYTSYA, A.;KVASNICKA, F.; COPIKOVA, J.; PARK, W.I. Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. **Carbohydr. Pol.**, v. 81, p. 41-48, 2010.

TABARSA, M.; LEE, S.; YOU, S. Structural analysis of immunostimulating sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa*. **Carbohydr. Res.**, v. 361, p.141–147, 2012.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Quim. Nova**, v. 27, p. 139-145, 2004.

VISHCHUK, O.S.; ERMAKOVA S.P.; ZVYAGINTSEVA. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharia japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity. **Carbohydr. Res.** v. 346, p. 2769-2776, 2011.

XIN, T.; ZHANG, F.; JIANG, Q.; CHEN, C.; HUANG D.; LI, Y.; SHEN, W.; JIN, Y.; SUIB, G. The inhibitory effect of a polysaccharide from *Codonopsis pilosula* on tumor growth and metastasis in vitro. **Int. J. of Biol. Macrom.**, v. 51, p. 788– 793, 2012.

YANG, C.; CHUNG, D; SHIN,I.; LEE, H.; KIM, J.; LEE, Y.; YOU, S. Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. **Int. J. of Biol. Macromol.**, v. 43, p. 433–437, 2008.

YE, H.; WANG, K.; ZHOU, C.; LIU, J.; ZENG, X. Purification, antitumor and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. **Food Chem.**, v. 111, p. 428–432, 2008.

YAN *et al.* IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **N Engl J Med**, v. 360, p.765-773, 2009.

WANG, H. *et al.* Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas. **Lab. Invest**, v. 84, n. 8, p. 941-951, 2004.

WANG, S.; CHENG, Y.; WANG, F.; SUN, L.; LIU, C.; CHEN, G.; LI, Y.; WARD, S.; QU, X. Inhibition activity of sulfated polysaccharide of *Sepiella maindroni ink* on matrix metalloproteinase (MMP)-2. **Biomed. & Pharmacot.**, v.62, p. 297-302, 2008

WEI, D.; WEI, Y.; CHENG, W.; ZHANG, L. Sulfated modification, characterization and antitumor activities of *Radix hedysari* polysaccharide. **Int. J. of Biol. Macromol.**, v. 51, p. 471–476, 2012.

WEINBERG, R. A. *A Biologia do Câncer*. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WICK W.; WAGNER S.; KERKAU S.; DICHGANS J.; TONN J.C.; WELLER M. BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. **FEBS Lett.**, v. 42, n. 440, p. 419-424, 1998.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KUN S.K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydr. Polym.**, v. 84, p.14-21, 2011.

WU, J.; ZHOU, J.; LANG, Y.; YAO, L.; XU, H.; SHI, H.; XU, S. A polysaccharide from *Armillaria mellea* exhibits strong *in vitro* anticancer activity via apoptosis-involved mechanisms. **Int. J. of Biol. Macromol.**, v. 51, p. 663– 667, 2012.

ZHOU, G.; SHENG, W.; YAO, H.; WANG, C. Effect of low molecular lambda-carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. **Pharmac. Res.**, v. 53, n. 2, p.129-134, 2006.

ZHOU, F.; LV, O.; ZHENG,Y.; WANG, J.; HU, P.; WANG,Z.; YANG, L. Inhibitory effect of *Pulsatilla chinensis* polysaccharides on glioma. **Int. J. of Biol. Macromol.**, v. 50, p. 1322–1326, 2012.

ZHU, C.; ZHANG, S. *Lycium barbarum* polysaccharide inhibits the proliferation of HeLa cells by inducing apoptosis. **J. Sci. Food Agric.**, v. 93, n.1, p.149-156, 2012.

ZIMMERMAN K.C.; BONZON C.; GREEN D.R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacolog. Ther.**, v. 92, p. 57– 70, 2002.